



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI BOLOGNA
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA**

**DOTTORATO DI RICERCA IN
EMATOLOGIA CLINICA E SPERIMENTALE
XX Ciclo, AA 2004/2005**

Coordinatore: Prof Stefano A. Pileri

Tesi di Laurea

**LA TERAPIA DELLE LEUCEMIE ACUTE MIELOIDI
A FENOTIPO MDR-PGP POSITIVO.
RISULTATI DEGLI STUDI CLINICI AML97, AML99, AML02
E PROSPETTIVE FUTURE**

**Relatore:
Chiar.mo Prof Stefano A. Pileri**

**Dottorando:
Dott Michele Malagola**

*Dedico questo lavoro
a Irene e Giulia*

INDICE

1. INTRODUZIONE	Pag 4
1.1 Le Leucemie Acute Mieloidi (LAM)	Pag 4
1.2 La farmacoresistenza	Pag 8
<i>1.2.1 La Farmacoresistenza o Multidrug Resistance (MDR) mediata dall'iperpressione della glicoproteina di trasporto p170 (Pgp)</i>	Pag 9
1.3 La Fludarabina	Pag 14
<i>1.3.1 Struttura, meccanismo d'azione e farmacocinetica</i>	Pag 15
1.4 Razionale per l'impiego clinico della Fludarabina nella terapia di induzione delle LAM	Pag 17
2. MATERIALI E METODI	Pag 19
2.1 Induzione della RC (FLAI)	Pag 19
<i>2.1.1 La strategia terapeutica post-induzione</i>	Pag 19
2.2 Valutazione immunofenotipica dell'espressione della MDR-Pgp nei blasti mieloidi delle LAM	Pag 20
3. RISULTATI	Pag 22
3.1 I protocolli di terapia	Pag 22
<i>3.1.1 Il protocollo AML 97</i>	Pag 22
<i>3.1.2 Il protocollo AML 99</i>	Pag 23
<i>3.1.3 Il protocollo AML 02</i>	Pag 25
3.2 Fludarabina ed MDR	Pag 26
3.3 Le complicanze infettive durante la terapia con regimi di induzione includenti Fludarabina	Pag 30
<i>3.3.1 Caratteristiche cliniche dei pazienti, strategia di profilassi e terapia delle infezioni durante la neutropenia</i>	Pag 32
<i>3.3.2 Risposta alla terapia di induzione e tossicità</i>	Pag 34
<i>3.3.3 Incidenza di infezioni batteriche e fungine durante la terapia di induzione</i>	Pag 34
<i>3.3.4 Incidenza di infezioni batteriche e fungine durante la terapia di consolidamento</i>	Pag 35
4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI	Pag 37
5. BIBLIOGRAFIA	Pag 45
Tabelle e Figure	Pag 64

1. INTRODUZIONE

1.1 Le Leucemie Acute Mieloidi (LAM)

Le Leucemie Acute Mieloidi (LAM) sono un gruppo eterogeneo di malattie neoplastiche del sistema emopoietico, caratterizzate dalla trasformazione leucemica di una cellula staminale emopoietica (CSE) che, perdendo la capacità maturativa e differenziativa, induce un'espansione del clone neoplastico e, secondariamente, un quadro di insufficienza midollare caratterizzato da una difettiva produzione di globuli bianchi normali, piastrine ed eritrociti (1).

L'incidenza delle LAM aumenta considerevolmente con l'avanzare dell'età e la frequenza è stimabile attorno ai 15 nuovi casi ogni 100 mila abitanti per anno. L'età di maggior incidenza è compresa tra i 60 e i 65 anni e la distribuzione nelle diverse aree geografiche e nelle differenti popolazioni risulta essere dipendente, oltre che da fattori genetici, anche da fattori ambientali. L'esposizione professionale o iatrogena a diversi agenti chimici (derivati del petrolio, pesticidi, solventi, farmaci citotossici) e alle radiazioni ionizzanti, sono tra i fattori più importanti in grado di aumentare significativamente il rischio di leucemia, anche se, a tutt'oggi, per la maggior parte di queste patologie, le cause e i meccanismi di leucemogenesi restano ancora non completamente chiariti (1).

Come precedentemente accennato, le LAM costituiscono un gruppo eterogeneo di neoplasie ematologiche, distinguibili per caratteristiche cliniche, citomorfologiche, immunofenotipiche, cariotipiche e molecolari.

L'attuale classificazione delle LAM, proposta dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (WHO) (2), che ha sostituito la precedente classificazione FAB (3) (French-American-British Co-operative Group, Tabella 1) considera questi fattori e, almeno in parte, rende conto dell'eterogeneità di queste malattie (Tabella 2). In particolare, nella classificazione WHO vengono distinte :

- LAM con anomalie genetiche ricorrenti, fra le quali ritroviamo la $t(8;21)(q22;q22)$, con riarrangiamento dei geni AML1/ETO, l' $inv(16)(p13q22)$ o $t(16;16)(q13q22)$, con riarrangiamento dei geni CBF β /MYH11, la $t(15;17)(q22q12)$, con riarrangiamento dei geni PML/RAR α e le anomalie della banda 11q23, con riarrangiamenti che coinvolgono il gene MLL;
- LAM con displasia multilineare;
- LAM correlate a precedente chemioterapia;
- LAM cosiddette "undefined".

La suddivisione delle LAM in gruppi con caratteristiche clinico/biologiche diverse è in genere correlata a prognosi differenti. Nonostante questo, ancora oggi le LAM, con l'eccezione della leucemia

acuta promielocitica, vengono trattate in modo indistinto. L'identificazione di entità cliniche e prognostiche differenti dovrebbe essere il presupposto perché vi possa essere in futuro un trattamento specifico per ogni tipo di leucemia. Sappiamo, ad esempio, che la prognosi delle LAM con t(8;21) o anomalie del cromosoma 16 è notevolmente migliore di quella delle LAM con displasia multilineare o delle LAM correlate a precedente chemioterapia. Tuttavia, esse vengono trattate con la medesima terapia di induzione e consolidamento, e l'unica variante consiste nella non indicazione al trapianto allogenico di cellule staminali emopoietiche in prima remissione completa. A queste differenze biologiche e prognostiche, quindi, non corrisponde un differente trattamento chemioterapico. L'unica eccezione, è rappresentata dalla LAM promielocitica con t(15;17) e riarrangiamento PML/RAR α . La terapia con un derivato della vitamina A, l'acido all-trans retinoico (ATRA), in combinazione con Idarubicina e Citosina Arabinoside, consente di ottenere, oggi, la guarigione in circa il 90% dei casi (4, 5). L'ATRA, legandosi al suo recettore (il gene PML/RAR α), permette di superare il blocco differenziativo, promuovendo la maturazione dei promielociti leucemici e bloccandone la proliferazione.

Con l'eccezione della LAM promielocitica appena descritta, gli altri tipi di LAM vengono ancora trattati, con regimi di polichemioterapia di induzione/consolidamento basati sulla

combinazione di un'antraciclina con la citosina arabinoside (Ara-C) (6 - 15) e, quando possibile e indicato, ricorrendo ad un trapianto autologo o allogenico di cellule staminali emopoietiche (auto e allo-SCT) (16, 17). In questo modo è possibile raggiungere la Remissione Completa (RC) nel 50-70% dei casi. La metà circa di questi pazienti però ricade, frequentemente entro il primo anno, e solo il 30-40% dei pazienti con LAM ha la probabilità di guarire (6 - 17).

I risultati appena illustrati non possono essere certo ritenuti soddisfacenti ed appaiono pressoché invariati negli ultimi 20 anni. Si è comunque osservato un lieve miglioramento nell'outcome dei pazienti e ciò appare ascrivibile principalmente a due ragioni:

- a) un miglioramento della terapia di supporto, in senso generale (introduzione dei fattori di crescita [G-CSF, EPO], maggiore disponibilità ed efficacia degli antibiotici, migliore impiego della terapia di supporto trasfusionale);
- b) l'estensione delle procedure trapiantologiche ad un numero sempre più largo di pazienti, unito al fatto che il trapianto di cellule staminali emopoietiche è diventato sempre più sicuro ed efficace.

A fronte di questi progressi, vanno sottolineati i grandi limiti che ancor'oggi gravano sulla terapia delle leucemie acute:

- la mancanza di nuovi farmaci, in particolare di nuove molecole in grado di bloccare il meccanismo o i meccanismi molecolari di leucemogenesi;
- l'impossibilità, almeno per il momento, di disporre di strategie terapeutiche in grado di superare la barriera della farmacoresistenza delle cellule leucemiche, che costituisce uno dei maggiori ostacoli al successo della terapia delle LAM.

1.2 La Farmacoresistenza

La farmacoresistenza (multidrug resistance, MDR) è una delle principali cause del fallimento della chemioterapia in oncoematologia. Essa può manifestarsi già alla diagnosi come resistenza intrinseca o primitiva, oppure può svilupparsi durante il trattamento, come resistenza acquisita (18-21).

La farmacoresistenza può essere mediata da diversi meccanismi quali:

- l'iperespressione di proteine trans-membrana o intracellulari che interferiscono in diversi modi con il metabolismo dei farmaci:
 - la “glicoproteina P170” o Pgp, codificata dal gene MDR₁ sul cromosoma 7 (Figura 1),

- la “lung resistance related protein”(LRP), codificata dal rispettivo gene sul cromosoma 13 (Figura 2),
 - la “multidrug resistance associated protein” (MRP), codificata dal corrispettivo gene sul cromosoma 16,
 - la “breast cancer resistance protein” [BCRP]) (22, 23).
- una modificazione qualitativa e/o quantitativa degli enzimi delle topoisomerasi I e II, coinvolti nei meccanismi di riparo del DNA, e a loro volta necessari per l’attività stessa dei farmaci antitumorali, come le antracicline e gli antracenedioni (24), detti appunto inibitori delle topoisomerasi.
 - l’iperespressione di enzimi detossificanti quali le glutatione-S-transferasi, coinvolti nella protezione della cellula dai danni ossidativi (25).

1.2.1 La farmacoresistenza o Multidrug Resistance (MDR) mediata dall’iperespressione della glicoproteina di trasporto P170 (Pgp)

La farmacoresistenza mediata dalla Pgp costituisce la forma di multidrug resistance aspecifica (MDR-Pgp) più frequente e anche più studiata nelle LAM (21, 22, 26). La Pgp, codificata dal gene MDR₁

situato sul braccio lungo del cromosoma 7 (7q21.1), è una glicoproteina di membrana, che la cellula utilizza come pompa di efflusso ATP-dipendente per diversi farmaci, molti dei quali usati comunemente negli schemi di polichemioterapia per il trattamento delle LAM (21, 22) (Figura 1). La proteina Pgp ha un peso molecolare di 170 Kd ed è composta di due dimeri di ugual peso con alta omologia di sequenza soprattutto nella regione C-terminale. Internamente alla proteina si trovano 12 regioni idrofobiche che corrispondono alle zone di attraversamento della membrana cellulare e, grazie all'analisi della struttura primaria, sono stati evidenziati inoltre 8 siti potenzialmente glicosilabili di cui 5 posti nella regione N-terminale. L'aggiunta di inibitori specifici della glicosilazione N-terminale impedisce i processi di modificazione post-traduzionale della proteina. Il tempo di dimezzamento della proteina è superiore alle 24 ore. Un altro dato importante è la presenza di due siti di legame per l'ATP posti in ciascuna metà della proteina sull'estremità carbossi-terminale.

La rilevanza clinica dell'iperespressione della Pgp è notevole, in quanto essa è presente in circa il 40% delle LAM all'esordio e nel 60-70% delle LAM ricadute/resistenti e delle LAM dell'anziano (> 60 anni) (25, 26). Inoltre numerosi studi clinici hanno messo in evidenza che la prognosi delle LAM iperesprimenti la Pgp è significativamente peggiore rispetto alle LAM non iperesprimenti la Pgp, sia in termini di probabilità

di raggiungimento della RC, che in termini di sopravvivenza libera da malattia (DFS) e sopravvivenza globale (OS) (Tabella 3) (22, 26 - 39).

Numerosi sono i farmaci che sono comunemente usati nel trattamento delle LAM e che vengono resi meno efficaci dal meccanismo di farmacoresistenza mediato dalla Pgp. In particolare ciò riguarda le antracicline (daunorubicina, doxorubicina e idarubicina), gli alcaloidi della vinca (vincristina e vinblastina), gli antracenedioni (mitoxantrone) e i derivati delle epipodofillotossine (etoposide) (Figura 3).

Questo importante fenomeno di farmacoresistenza mediato dalla proteina Pgp è stato studiato estesamente *in vitro* su coppie di linee cellulari costituite da una linea sensibile (wild type) e da una sublinea resistente, iperesprimente la glicoproteina Pgp. In questi studi *in vitro* è stato osservato come l'inibizione della crescita della linea cellulare resistente (MDR-Pgp-positiva) necessitasse di concentrazioni di farmaci antiblastici più elevate e come l'impiego di molecole in grado di inibire l'attività della Pgp fosse in grado di ristabilire la sensibilità ai farmaci antiblastici, la cui attività ritornava ad essere comparabile a quella osservata nelle linee sensibili (wild type) (20, 21, 22). Sia *in vitro* che *in vivo*, direttamente sui blasti leucemici dei pazienti, è stato inoltre dimostrato che la concentrazione intracellulare dei farmaci antiblastici era significativamente più bassa nelle cellule leucemiche MDR-Pgp-

positive e ciò spiega la minore efficacia della terapia osservabile *in vivo* nei pazienti.

Restano ancora da chiarire del tutto i meccanismi che permettono alla Pgp di riconoscere ed espellere dalle cellule farmaci diversi, strutturalmente non correlati. Sono state formulate due principali ipotesi che possono spiegare il fenomeno: nella prima viene proposta l'esistenza di proteine intermedie che fungano da carriers per i vari antitumorali. Il complesso carrier-antitumorale viene poi espulso attraverso i canali idrofilici della Pgp, con un meccanismo attivo ATP dipendente. In questo modo carriers differenti servirebbero all'eliminazione dei diversi farmaci. Secondo un'altra ipotesi i farmaci vengono espulsi dalla cellula per interazione diretta tra antitumorale e Pgp (21, 22).

Le conseguenze cliniche che derivano da questo fenomeno sono, quindi, molto importanti, ed, *in vivo*, sono state studiate e impiegate diverse strategie terapeutiche al fine di eludere questo meccanismo di resistenza farmacologica. In molti studi clinici si è cercato di superare il problema della farmacoresistenza Pgp-mediata intensificando la terapia convenzionale, utilizzando regimi di induzione sempre più intensivi basati su dosaggi più elevati di chemioterapici (6, 7, 12-14, 16, 17). I risultati di questi studi indicano abbastanza chiaramente che la risposta alla terapia non è migliorata in modo significativo, mentre la tossicità è

quasi sempre aumentata, sia quella ematologica che extra-ematologica. (14 - 17).

Altri studi clinici hanno valutato l'impiego di agenti cosiddetti "revertanti" la Pgp, quali la ciclosporina A, il suo derivato PSC 833 o il dx-Verapamil. Nonostante tali molecole si siano dimostrate, *in vitro*, efficaci nell'inibire l'attività della Pgp (40 - 42), il loro impiego *in vivo* ha portato a dei risultati terapeutici piuttosto deludenti (43 - 45). Infatti, a fronte di un non chiaro beneficio in termini di ottenimento e durata di RC, si è quasi sempre verificato un incremento della tossicità soprattutto epatica, gastrointestinale e neurologica nei pazienti trattati con agenti revertanti la Pgp (43 - 45) e, pertanto, il loro impiego non è mai entrato nella pratica clinica corrente del trattamento delle LAM.

Un' importante alternativa terapeutica, potenzialmente in grado di superare il fenomeno della farmacoresistenza sarebbe quella di disporre di farmaci non MDR-Pgp dipendenti che essendo espulsi in modo minore rispetto ai farmaci tradizionali, potrebbero essere in grado di esercitare un maggiore effetto tossico sulle cellule leucemiche. Alcuni studi *in vitro* hanno confrontato la citotossicità della daunorubicina e della doxorubicina rispetto a quella dell'idarubicina, in linee cellulari MDR-Pgp positive e negative, dimostrando che le linee cellulari MDR-Pgp positive risultano significativamente più resistenti alla daunorubicina e doxorubicina rispetto all'idarubicina (21). Altri studi *in*

vitro hanno testato l'effetto citotossico dell'Ara-C da sola o in combinazione con Fludarabina, sempre in linee cellulari MDR positive e negative, dimostrando che l'associazione Fludarabina e Ara-C è più citotossica di ciascuno dei due farmaci usati singolarmente, soprattutto sulle linee cellulari MDR-Pgp positive e che pertanto esiste, almeno *in vitro*, un sinergismo biologico fra i due farmaci (46).

Le considerazioni generali sopra riportate e queste ultime, riguardanti nello specifico il potenziale vantaggio dell'impiego di farmaci non dipendenti dall'azione della Pgp, sono state la premessa e il rationale per pianificare una serie di studi clinici, aventi come punto centrale della sperimentazione l'impiego della Fludarabina nella terapia d'induzione delle LAM dell'adulto.

1.3 La Fludarabina

La Fludarabina (9-beta-D-arabinofuranosil-2-fluoradenin-5'-fosfato, 2F-ara-AMP) è un analogo purinico per la prima volta sintetizzato nel 1982 da ricercatori americani e utilizzato in modo estensivo nel trattamento dei linfomi e delle sindromi linfoproliferative croniche (47 - 49). Più recentemente il campo di utilizzo della Fludarabina si è esteso alla terapia di condizionamento al trapianto di cellule staminali emopoietiche allogeniche ad intensità ridotta (allo-SCT RIC), dove il farmaco viene utilizzato per le sue proprietà

immunosoppressive (50, 51) e alla terapia di alcune malattie autoimmuni come l'artrite reumatoide e la psoriasi (52, 53).

L'impiego della Fludarabina nella terapia delle LAM è stato meno studiato e il suo utilizzo, in associazione con una antraciclina e l'Ara-C, è stato riservato, come terapia di salvataggio o di seconda linea, soprattutto alle LAM primariamente refrattarie alla terapia di induzione o alle LAM ricadute (54 – 59). In questo gruppo di pazienti la terapia di salvataggio contenente Fludarabina, si è dimostrata efficace e relativamente poco tossica (54 – 59).

1.3.1 Struttura, meccanismo d'azione e farmacocinetica

La Fludarabina è un analogo delle purine, derivato dell'Ara-C, potente chemioterapico impiegato in combinazione con le antracicline nei comuni regimi di chemioterapia di induzione e consolidamento delle LAM (6 – 15).

Il metabolismo del farmaco prevede diverse tappe. In primo luogo, la Fludarabina viene defosforilata a 2F-Ara-A in ambiente extracellulare, poi rifosforilata a 2F-Ara-ATP, in ambiente intracellulare, per azione della deossicitidina chinasi (Figura 4). Questo metabolita attivo inibisce la sintesi del DNA, interferendo con le polimerasi α , δ ed ϵ e con la DNA primasi. Il composto 2F-Ara-ATP inibisce anche la DNA primasi, la

DNA ligasi, la ribonucleotide redattasi e al RNA polimerasi II. Il risultato è una inibizione della sintesi di DNA, dei sistemi di riparo del DNA e della crescita cellulare nonché, probabilmente, un'induzione dell'apoptosi (Tabella 4) (60).

Due caratteristiche peculiari della Fludarabina sono il fatto che essa è resistente alla deaminazione ad opera della deossicitidina deaminasi (Figura 5) e che non è trasportata dalla glicoproteina transmembrana P170 (60). Questo è particolarmente importante nell'ambito delle LAM, in cui l'efficacia dell'Ara-C, il farmaco cardine della terapia di prima linea, è condizionata da meccanismi di resistenza messi in atto dalle cellule neoplastiche, che si esplicano soprattutto mediante deaminazione dell'Ara-C ad opera della deossicitidina deaminasi, con sintesi di uracil arabinoside (Ara-U), metabolita inattivo della citarabina.

Dato il meccanismo d'azione della Fludarabina, è stato pertanto ipotizzato e dimostrato un sinergismo d'azione con l'Ara-C (61 – 65) e più in generale con i farmaci cosiddetti inibitori della Topoisomerasi II, quali le antracicline e gli antracenedioni, gli alchilanti come il cis-platino e le radiazioni ionizzanti. Nel primo caso l'inibizione dell'enzima ribonucleotide reduttasi, inducendo una diminuzione dei deossinucleotidi, determina una aumentata attività dell'enzima deoxycitidine-chinasi in grado di accelerare la trasformazione dell'Ara-C

nel suo metabolita attivo d-ara-CTP. Nel secondo caso l'inibizione degli enzimi della DNA-polimerasi, DNA-ligasi e DNA-girasi, coinvolti nei processi di riparazione del DNA, aumenterebbe i danni prodotti da i farmaci inibitori delle Topoisomerasi (Figura 5).

1.4 Razionale per l'impiego clinico della Fludarabina nella terapia di induzione delle LAM.

Il razionale che è stato seguito per valutare l'impiego della Fludarabina nella terapia di prima linea delle LAM è riassunto sinteticamente nei seguenti punti:

- studi *in vitro* hanno mostrato che la Fludarabina ha un sinergismo d'azione con l'Ara-C e con i farmaci inibitori della Topoisomerasi II, quali le antracicline e gli antracenedioni e gli alchilanti;
- la Fludarabina ha un'attività mielotossica, sia pur moderata;
- la Fludarabina, *in vitro*, non appare essere un farmaco Pgp dipendente.
- regimi di salvataggio includenti la Fludarabina si sono rivelati efficaci e relativamente poco tossici nei pazienti con LAM refrattari e ricaduti dopo terapia convenzionale.

Sulla base di tali premesse, è stato ritenuto ragionevole andare a valutare, *in vivo*, se l'impiego di un agente antiblastico non MDR-correlato quale la Fludarabina combinato con l'Ara-C e una antraciclina, poteva essere un' alternativa concreta per cercare di superare il problema della farmacoresistenza Pgp-mediata e migliorare l'efficacia della terapia di induzione nelle LAM. Sono stati quindi pianificati degli studi clinici sperimentali prospettici al fine di valutare:

- la tollerabilità e l'efficacia di un regime includente Fludarabina + Ara-C + Idarubicina (FLAI) in pazienti con LAM di nuova diagnosi e di età inferiore ai 65 anni. Lo studio pilota di fase II, AML 97, ha permesso di evidenziare che il FLAI è uno schema di induzione efficace e poco tossico, in particolare per ciò che riguarda gli effetti collaterali extraematologici (66);

- la superiorità di tale regime includente Fludarabina rispetto ad uno schema di terapia di induzione convenzionale (ICE). I risultati dello studio multicentrico, randomizzato di fase III hanno confermato questa ipotesi (67);

- l'efficacia di FLAI nel subset dei pazienti con LAM-MDR-Pgp-positivi (68).

2. MATERIALI E METODI

2.1 Induzione della RC (FLAI)

Il ciclo di induzione impiegato nell'ambito dei tre studi multicentrici sopra citati era così disegnato:

FARMACO	DOSE	GIORNI
Fludarabina	30 mg/m ² /die	per 5 giorni consecutivi
Ara-C	2 g/m ² /die	per 5 giorni consecutivi
Idarubicina	12 mg/m ² /die	giorni 1,3,5

2.1.1 La strategia terapeutica post-induzione

Nei pazienti arruolati negli studi clinici AML 97, AML 99 e AML 02 la terapia di induzione era seguita da uno o due cicli di consolidamento, rappresentati da un secondo ciclo FLAI di tre giorni, seguito da un ciclo MEC (Mitoxantrone, Ara-C ed Etoposide) nel protocollo AML 97 e da due cicli contenenti Ara-C ad alte dosi nei protocolli AML 99 e AML 02. Successivamente, l'intensificazione prevedeva di portare ad allo-SCT tutti i pazienti di età inferiore a 55 anni, con un donatore HLA compatibile e con una malattia ad alto rischio (leucocitosi e/o cariotipo sfavorevole e/o iperespressione della

Pgp). In tutti gli altri casi, ove possibile, era prevista una raccolta di cellule staminali autologhe dopo il terzo consolidamento e un successivo auto-SCT.

2.2 Valutazione immunofenotipica dell'espressione della MDR-Pgp nei blasti mieloidi delle LAM

Lo studio della Pgp, codificata dal gene MDR₁, può essere effettuato con differenti metodiche (immunofenotipiche, immunoistochimiche, molecolari e/o mediante saggi funzionali). Per definire l'espressione della Pgp, la metodica impiegata nei nostri studi si basava sulla determinazione dell'immunofenotipo delle cellule leucemiche mediante l'impiego di un anticorpo monoclonale specifico (MRK-16 [Kamiya]), diretto verso un epitopo extracellulare della Pgp (22). Le cellule mononucleate prelevate dal midollo osseo dei pazienti leucemici, venivano separate su un gradiente di Ficoll, in modo da ottenere almeno 1×10^6 cellule blastiche. Dopo un fissaggio in paraformaldeide e due lavaggi in siero, le cellule blastiche venivano incubate con l'anticorpo MRK-16 (2 µg/ml) e successivamente con un secondo anticorpo fluorescinato, in grado di legarsi all'anticorpo MRK-16. L'analisi citofluorimetrica permetteva quindi di misurare la fluorescenza delle cellule incubate con MRK-16 espressa a sua volta

come Indice di Fluorescenza Medio (Mean Fluorescence Index, MFI), risultante dal rapporto tra la fluorescenza media delle cellule del campione in esame e la fluorescenza media del campione di controllo. L'analisi citofluorimetrica dell'espressione della Pgp è stata preferita alla misurazione semplice del numero di cellule positive con la metodica di immunocitochimica, in quanto tale metodica è in grado di fornire una misura oggettiva dell'espressione della Pgp (22).

3. RISULTATI

3.1 I protocolli di terapia

3.1.1 Il protocollo AML 97

Lo studio clinico AML 97 era uno studio pilota fase II basato sull'impiego del FLAI nella terapia di induzione e consolidamento di pazienti con LAM di nuova diagnosi e di età inferiore a 65 anni. Gli obiettivi principali dello studio erano: valutare la fattibilità, l'efficacia (%RC) e la tossicità del FLAI e valutare, dopo terapia di induzione e consolidamento, la fattibilità della procedura di raccolta delle PBSC.

In questo studio erano stati arruolati 45 pazienti affetti da LAM all'esordio, di età inferiore ai 65 anni, e i risultati erano così riassumibili (66):

- la RC dopo un ciclo FLAI veniva ottenuta nel 71% di casi;
- la tossicità ematologica risultava comparabile a quella di altri regimi convenzionali;
- la tossicità extraematologica, in particolare quella sul tubo digerente non risultava rilevante;

- la sopravvivenza libera da malattia proiettata in 4 anni era stimabile nell'ordine del 38%, dopo un tempo mediano di osservazione di 26 mesi (range 2 – 74);
- la frequenza e la durata della RC nei 18 pazienti MDR-Pgp positivi, iperesprimenti la Pgp (MFI ≥ 6), risultava del tutto comparabile a quella dei 27 pazienti MDR-Pgp negativi, ipoesprimenti la Pgp (MFI < 6);
- nessun parametro analizzato (sesso, età, numero di leucociti, anomalie del cariotipo ed espressione della Pgp) risultava essere significativamente correlato con la RC e la sua durata.

3.1.2 Il protocollo AML 99

Lo studio clinico AML 99 era uno studio randomizzato di fase III volto al confronto di due diversi tipi di chemioterapia di induzione (FLAI e ICE [Idarubicina (10 mg/m²/die per 3 giorni, gg 1, 3, 5), Ara-C (100 mg/m²/die in perfusione continua per 10 giorni consecutivi) ed Etoposide (100 mg/m²/die per 5 giorni consecutivi)] in pazienti con LAM di nuova diagnosi e di età inferiore ai 60 anni (67). Gli obiettivi dello studio erano:

- determinare l'efficacia del FLAI e dell'ICE in termini di frequenza e durata della RC;

- valutare in modo comparativo la tossicità ematologica ed extraematologica del FLAI vs ICE;
- valutare l'efficacia del FLAI vs ICE nei pazienti MDR positivi.

In questo studio erano stati randomizzati 112 pazienti: 57 trattati con FLAI e 55 con ICE.

I risultati di questo studio erano così riassumibili:

- la percentuale di RC con lo schema FLAI risultava più alta rispetto a quella ottenuta con l'ICE (74% vs 51%; $p=0.01$) e del tutto sovrapponibile rispetto a quella ottenuta nello studio precedente AML 97;
- la tossicità ematologica del FLAI risultava significativamente inferiore a quella osservata per l'ICE;
- la tossicità extraematologica del FLAI intesa come eventi di grado III-IV WHO risultava significativamente inferiore a quella dell'ICE, soprattutto per quando riguarda l'incidenza di effetti collaterali sul tubo digerente (diarrea, nausea, vomito, mucosite);
- con un follow up mediano di 17 mesi, l'OS globale a 4 anni era del 32% in entrambi i gruppi (Figura 6). Il DFS a 4 anni era del 31.5% nel braccio FLAI, e del 44% nel braccio ICE (Figura 6). Di tutte le variabili biologiche analizzate soltanto la citogenetica si dimostrava un fattore predittivo di OS per i pazienti con cariotipo normale o con $inv(16)$ e $t(8; 21)$, rispetto agli altri;

- suddividendo i pazienti in base all'espressione dell'MDR si osservava un trend verso una maggiore percentuale di RC nei pazienti MDR positivi trattati con FLAI rispetto ai pazienti trattati con ICE e, similmente, un OS tendenzialmente superiore (Figura 7). I numeri, tuttavia, erano troppo piccoli e il follow up ancora troppo breve per trarre conclusioni significative, ma questo dato poteva essere interpretato come indicativo di un'azione efficace della Fludarabina nel superamento dell'effetto dell'MDR.

3.1.3 Protocollo clinico AML 02

Con lo scopo di migliorare la percentuale di RC rispetto ai protocolli AML 97 e AML 99 è stato disegnato il protocollo AML 02, in cui veniva aggiunto un quarto farmaco nella terapia di induzione (Etoposide), con l'obiettivo di valutare se questo poteva incrementare la percentuale di RC.

I risultati dello studio non sono ancora stati pubblicati. Sinteticamente, FLAIE non è risultato superiore al FLAI in termini di RC (72%) e la sua tossicità è risultata lievemente superiore a quella del FLAI.

3.2 Fludarabina e MDR

Dei 203 pazienti con LAM di nuova diagnosi e di età \leq a 65 anni trattati con un regime includente Fludarabina (FLAI / FLAIE) consecutivamente arruolati nei protocolli AML 97, AML 99 e AML 02, sono stati selezionati 106 pazienti per i quali erano disponibili i dati clinici (età al momento della diagnosi e sesso) e biologici (numero di leucociti, cariotipo, espressione della Pgp), nonché un follow up adeguato di almeno 24 mesi, per eseguire una analisi statisticamente accurata con l'obiettivo di verificare il ruolo della Fludarabina nella terapia delle LAM a fenotipo MDR-Pgp positivo (38).

Le caratteristiche cliniche e biologiche dei 106 pazienti analizzati sono riportate nella Tabella 5. In particolare, 39 pazienti (37%) mostravano una iperespressione della Pgp e il 67 pazienti (63%) risultavano Pgp negativi. Nell'ambito dei fattori biologici prognosticamente rilevanti, i pazienti MDR-Pgp positivi mostravano più spesso un cariotipo sfavorevole (46% vs 21%; $p= 0.006$). Non vi erano, invece, differenze significative per quanto riguarda gli altri parametri biologici. La terapia di induzione contenente Fludarabina ha portato in RC 74 pazienti su 106 (70%); il 28% dei pazienti (30/106) è risultato primariamente resistente e il 2% dei pazienti (2/106) è deceduto durante il ciclo di induzione (Tabella 6). La risposta alla terapia di induzione nei

106 casi trattati con regime di induzione includente Fludarabina e nei 106 controlli trattati con regime di induzione convenzionale, rispetto al fenotipo MDR-Pgp è riportata nella Tabella 7. Si può osservare che la percentuale di pazienti che ottengono una RC dopo un ciclo di FLAI/FLAIE (casi) è risultata sovrapponibile sia nei pazienti MDR positivi che nei pazienti MDR negativi (61% vs 75%; $p=0.16$). Al contrario, nei pazienti trattati con regime convenzionale non includente Fludarabina (controlli), la percentuale di RC nei pazienti iperesprimenti la Pgp è risultata significativamente inferiore rispetto a quella che si osserva nei pazienti non iperesprimenti la Pgp (44% vs 67%; $p=0.02$). Nella Tabella 8 è riportata la risposta all'induzione nei pazienti MDR-Pgp positivi e in quelli MDR-Pgp negativi, rispetto alla terapia ricevuta. Il dato più interessante è rappresentato dal fatto che la percentuale più bassa di risposte è stata ottenuta nei pazienti iperesprimenti la Pgp e trattati con un regime di induzione non includente Fludarabina (17/39; 44%). Questa percentuale è risultata inferiore rispetto a quella dei pazienti MDR-Pgp positivi trattati con FLAI/FLAIE (24/39; 61%; $p=0.11$). L'analisi univariata e multivariata eseguite sulle variabili cliniche e biologiche hanno dimostrato un impatto prognostico sulla RC del cariotipo (univariata; $p=0.007$) e del fenotipo MDR-Pgp (univariata e multivariata; $p=0.007$) (Tabelle 9 e 10).

Nella Figura 8 sono riportati l'OS e il DFS dei 212 pazienti inclusi nell'analisi, in base alla terapia di induzione ricevuta. L'OS e il DFS a 4 anni sono risultati superiori nei pazienti trattati con regimi di induzione includenti Fludarabina [OS a 4 aa: 40.6% (95% CI 26.2–55.0) vs 30.2% (95% CI 19.1–41.2), $p=0.05$; DFS a 4 aa: 33.6% (95% CI 20.1–47.2) vs 17% (95% CI 8.2–25.9), $p=0.06$]. L'analisi effettuata in base al fenotipo MDR ha mostrato che l'OS ed il DFS dei pazienti MDR-Pgp positivi rispetto a quelli MDR-Pgp negativi trattati con regimi di induzione includente Fludarabina sono risultati sovrapponibili [OS a 4 aa: 33.5% (95% CI 12.8–54.2) vs 46.2% (95% CI 26.6–65.6), $p=0.27$; DFS a 4 aa: 28.1% (95% CI 6.1–50.0) vs 33.8% (95% CI 17.0–50.5), $p=0.67$]. Al contrario, l'OS ed il DFS dei pazienti trattati con regimi convenzionali, non includenti Fludarabina sono risultati significativamente migliori nei pazienti non iperesprimenti la Pgp rispetto a quelli iperesprimenti la Pgp [OS a 4 aa: 40.0% (95% CI 24.8–55.3) vs 9.6% (95% CI 0 – 21.3), $p=0.0006$; DFS a 4 aa: 18.8% (95% CI 7.5–30.2) vs 6.5% (95% CI 0 – 17.4), $p=0.007$]. Nelle Figure 9 e 10 sono riportati i dati di sopravvivenza rispetto alla terapia di induzione ricevuta: l'OS e il DFS dei pazienti MDR-Pgp positivi sono risultati significativamente superiori quando è stato impiegato un regime di induzione includente Fludarabina [OS a 4 aa: 33.5% (95% CI 12.8–54.2) vs 9.6% (95% CI 0–21.3), $p=0.01$; DFS a 4 aa: 28.1% (95% CI 6.1–50.0) vs 6.5% (95% CI 0–17.4),

p=0.004 – Figura 9]. Questa stessa differenza significativa non è stata trovata nei pazienti MDR-Pgp negativi [OS a 4 aa: 46.2% (95% CI 26.6–65.6) vs 40.0% (95% CI 24.8–55.3), p=0.51; DFS a 4 aa: 33.8% (95% CI 17.0–50.5) vs 18.8% (95% CI 7.5 – 30.2), p=0.65 – Figura 10].

3.3 Le complicanze infettive durante la terapia con regimi di induzione includenti Fludarabina

Come precedentemente sottolineato, la Fludarabina, è un analogo delle purine, largamente utilizzato nella terapia delle Sindromi Linfoproliferative Croniche e dei Linfomi indolenti, dove da sola o combinata alla chemio-immunoterapia (alchilanti, antracicline, rituximab), ha permesso il raggiungimento di risultati soddisfacenti in termini di remissioni complete e sopravvivenza libera da malattia (47 – 49, 69 - 72). Dall'analisi dei risultati degli studi sull'impiego della Fluda nelle Sindromi Linfoproliferative Croniche, emerge, tuttavia, un aspetto importante, relativo alla tossicità infettiva osservata in questi pazienti. In particolare, le caratteristiche della malattia, che, specie nelle fasi più avanzate, si accompagna ad un elevato grado di immunosoppressione riguardante sia il compartimento B che T linfocitario, assieme alle proprietà immunosoppressive della Fluda, hanno contribuito ad incrementare in modo significativo l'incidenza di infezioni da germi opportunisti, funghi e virus come CMV (69 - 72). In alcune casistiche l'incidenza di queste complicanze può superare anche il 50% dei casi (69 - 72).

Noi pensiamo, pertanto, che una certa reticenza da parte dei Clinici sull'impiego estensivo di regimi di induzione per le LAM

contenenti Fluda possa essere in parte spiegata dal timore che questi regimi di induzione possano contribuire ad incrementare il rischio di infezioni soprattutto fungine, in una popolazione di pazienti per definizione ad alto rischio di sviluppare una Infezione Fungina Invasiva (IFI). E, d'altra parte, riteniamo che una IFI in un paziente affetto da LAM, rappresenti un vero "disastro", perché è gravata da una elevata morbilità e mortalità (73 – 75) e perché spesso causa un inevitabile ritardo nel programma terapeutico del paziente, incrementando il rischio di recidiva o compromettendo l'esecuzione di terapia ad alte dosi, seguita da reinfusione di cellule staminali autologhe o allogeniche.

Questa ipotesi è stata il presupposto per raccogliere retrospettivamente i dati di 224 pazienti affetti da LAM di nuova diagnosi ed età inferiore a 65 aa, consecutivamente trattati con un regime di induzione includente Fluda, nell'ambito dei tre studi clinici controllati precedentemente illustrati dal 1997 al 2002 (AML97, AML99 e AML02) e valutare l'incidenza di infezioni batteriche e fungine durante l'induzione e il primo consolidamento.

3.3.1. Caratteristiche cliniche dei pazienti, strategia di profilassi e terapia delle infezioni durante la neutropenia.

Le caratteristiche di questo gruppo di pazienti sono riportate nella Tabella 11. In particolare 135 pazienti (60%) sono stati trattati secondo lo schema FLAI [AML97 (n=70) e AML99 (n=65)] e 89 pazienti (40%) secondo lo schema FLAIE (AML02). E' importante sottolineare che la gestione clinica di questi malati è stata uniforme per tutto il periodo di osservazione, in quanto gli 11 Centri Ematologici italiani che hanno partecipato agli studi clinici hanno adottato le stesse misure di profilassi e terapia delle infezioni. In particolare, tutti i pazienti hanno ricevuto una profilassi antibatterica e antifungina (chinolonico ed itraconazolo, rispettivamente) durante la durata della neutropenia; il fattore di crescita granulocitario è stato utilizzato per accelerare il recupero dei polimorfonucleati, solo in caso di infezione clinicamente significativa. Al momento del ricovero, tutti i pazienti sono stati sottoposti a tamponi ed emocolture di sorveglianza, così come ad una radiografia del torace, che è stata successivamente ripetuta ogni settimana. Il “work up” diagnostico in caso di febbre è sempre stato omogeneo in tutto il gruppo di pazienti. In sintesi, in caso di febbre (una puntata $> 38.5^{\circ}\text{C}$ o almeno due puntate consecutive $> 38^{\circ}\text{C}$), veniva iniziata una terapia antibiotica ad ampio spettro (penicillina o cefalosporina, in associazione o meno con

aminoglicoside). In caso di positività di esami colturali, la terapia antibiotica empirica, veniva sostituita dalla terapia antibiotica mirata. In caso di febbre persistente da più di 5 giorni, nonostante terapia antibiotica empirica ed in assenza di segni/sintomi riferibile ad infezione localizzata, la terapia antifungina veniva iniziata in relazione alla politica di ciascun Centro (amfotericina B desossicolato, amfotericina B liposomiale, voriconazolo, caspofungin).

La definizione di infezione batterica richiedeva l'isolamento di batteri Gram positivi o negativi nelle emocolture. La diagnosi di IFI possibile, probabile o certa, veniva effettuata sulla base dei dati clinici, radiologici e microbiologici (76, 77; Tabella 12).

Il tasso di RC si è confermato compreso tra il 67% ed il 72%, senza alcuna differenza significativa nei tre gruppi di pazienti. Dal 2000, per il miglior inquadramento diagnostico delle IFI, tutti i pazienti con FUO resistente a terapia antibiotica empirica sono stati sottoposti ad una TAC del torace ad alta risoluzione (78, 79). A partire dal 2002, un prelievo di sangue periferico per la valutazione dell'antigene galattomannano è stato effettuato sempre più estensivamente in tutti i pazienti al momento dell'insorgenza della febbre e ogni 48 ore, fino a risoluzione del quadro (79). In caso di evidenza radiologica di infezione polmonare, una broncoscopia con BAL è stata quasi sempre eseguita.

3.3.2 Risposta alla terapia di induzione e tossicità

In Tabella 11 è riportata la risposta alla terapia di induzione in termini di RC, decessi in induzione e non risposta. Come atteso, non ci sono state differenze significative nei tre gruppi di pazienti. Anche la tossicità ematologica ed extraematologica è stata paragonabile nei pazienti arruolati nel protocollo AML97, AML99 e AML02. Il tempo mediano di recupero di un numero di polimorfonucleati $> 1.000/\text{mmc}$ e di piastrine $> 100.000/\text{mmc}$ è stato di 26 (19-60) e 28 (19-72) giorni, rispettivamente. Il numero di episodi di tossicità extraematologica di grado III-IV WHO è stato di 6, 5 e 10 nei protocolli AML97, AML99 e AML02, rispettivamente.

3.3.3. Incidenza di infezioni batteriche e fungine durante la terapia di induzione.

L'incidenza di febbri di origine ignota (FUO) e delle infezioni batteriche e fungine durante la terapia di induzione è riportata in Tabella 13. Centosedici pazienti su 224 (65%) hanno sviluppato una FUO, 30 (13%) e 47 (21%) una infezione batterica sostenuta da Gram negativi e positivi, rispettivamente. Il 6% dei pazienti (14/224) ha sviluppato una IFI possibile e il 4% (10 pazienti) una IFI probabile o certa. In

particolare, le IFI certe sono state sostenute da *A. species* (4 episodi di polmonite), *A. fumigatus* (1 episodio di polmonite), *A. flavus* (1 episodio di polmonite), *C. galbrata* (1 episodio di infezione del CVC) e *C. krusei* (1 episodio di polmonite). Dei pazienti che hanno sviluppato una IFI certa durante l'induzione, 3 hanno ottenuto una RC, 4 sono risultati resistenti e 1 è deceduto durante l'induzione (sepsi da *C. glabrata*, con infezione del CVC). L'IFI si è risolta in solamente nei tre i pazienti che hanno ottenuto la RC (1 polmonite da *A. fumigatus* e 3 polmoniti da *A. species*).

3.3.4. Incidenza di infezioni batteriche e fungine durante la terapia di consolidamento.

Duecentoquattordici pazienti su 224 (95%) consecutivamente trattati con un regime di induzione includente Fluda sono stati sottoposti ad un primo ciclo di consolidamento (Tabella 14). Il consolidamento è stato FLAI-3 o MEC-4 in 47 e 20 pazienti, rispettivamente (AML97); HD-AC in 63 pazienti (AML99); e Ida-HD-AC in 84 pazienti (AML02). L'incidenza di FUO, infezioni da Gram negativi e positivi è stata del 35% (75/214), 20% (43/214) e 19% (40/214), rispettivamente. Rispetto all'induizione, l'unica differenza significativa è stata osservata per quanto riguarda l'incidenza di FUO (65% vs 35%, $p=0.0001$, Tabella

14). Il 3% dei pazienti (6/214) ha sviluppato una IFI possibile. Gli episodi di IFI certa sono stati 5 (incidenza di IFI probabili/certe: 2%). In particolare, sono stati registrati 3 episodi di polmonite da *A. fumigatus*, 1 episodio di sepsi da *Fusarium spp.* Ed un episodio di sepsi con localizzazioni epatospleniche da *C. albicans*. I 5 pazienti che hanno sviluppato una IFI certa dopo il consolidamento non sono risultati gli stessi che avevano sviluppato una IFI certa durante l'induzione. L'IFI si è risolta solamente in uno dei tre pazienti in RC al momento del consolidamento (sepsi da *C. albicans* con localizzazioni epato-spleniche). Negli altri 2 pazienti in RC (2 polmoniti da *A. fumigatus*) e nei 2 pazienti resistenti (1 polmonite da *A. fumigatus* e 1 sepsi da *Fusarium spp.*) l'IFI non si è, invece, risolta.

4. DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Negli ultimi 30 anni la terapia “convenzionale” delle LAM è rimasta sostanzialmente invariata e con essa anche i risultati che sono stati ottenuti. Alla base di tutto ciò vi sono dei motivi che solo in parte sono conosciuti. Crediamo che le principali ragioni dell’insufficiente progresso della terapia delle LAM possano essere individuate nella non completa conoscenza dei meccanismi biologici della leucemogenesi e nella mancanza di farmaci selettivi ed efficienti contro le cellule leucemiche.

La combinazione di Citosina Arabioside con un’antraciclina rimane ancora il gold standard della terapia delle LAM. Nel corso degli anni si è cercato di migliorare l’efficienza di tale combinazione utilizzando l’Ara-C a dosi intermedio-alte o aggiungendo un terzo farmaco (Etoposide, 6-Tioguanina), ma questi tentativi sono risultati sostanzialmente vani. A fronte di un incremento, quasi mai significativo, della frequenza e della durata delle RC, si è registrato, quasi sempre, un incremento della tossicità ematologica e soprattutto extra-ematologica con relativo incremento della morbilità e mortalità (6 – 15, 80 - 82).

A partire dagli anni 90 la ricerca dell’intensificazione della terapia di induzione delle LAM è stata progressivamente abbandonata in luogo

della ricerca di terapie, se non più efficienti, sicuramente più selettive e meno tossiche. In questo diverso scenario, che ha come modello la diagnosi e la terapia della LAM promielocitica, s'inquadrano i moltissimi studi biologici sui meccanismi di farmacoresistenza e le altrettanto numerose esperienze cliniche che sono state portate avanti e che vengono eseguite con il fine principale di ottimizzare la terapia convenzionale (18 – 46). E' con questa finalità che è stato sperimentato l'uso dei "revertanti" (ciclosporina-A, PSC 833, Dx Verapamil, ATRA), molecole in grado di inibire l'attività di pompa della Pgp (43 – 45), ed è con questa finalità che l'Idarubicina e il Mitoxantrone vengono sempre più spesso impiegati al posto della "vecchia" Daunorubicina, la prima perché più efficiente *in vitro* sulle cellule leucemiche MDR/Pgp-positive (21, 23), il secondo perché meno cardiotossico (23). L'esperienza sull'impiego della Fludarabina nel trattamento di prima linea delle LAM, al momento in cui viene intrapresa, s'inquadra nello scenario sopradescritto e matura come conseguenza clinica degli studi biologici sui meccanismi di multidrug-resistance delle leucemie, portati avanti negli ultimi 10 anni (19 – 22, 24 – 42).

Il rationale dell'impiego della Fludarabina in associazione con l'Idarubicina e l'Ara-C è riassumibile come segue:

- la Fludarabina mostra una attività mielotossica non dipendente dalla Pgp.

- la Fludarabina mostra, almeno *in vitro*, un sinergismo con l'Ara-C;
- per il suo particolare metabolismo, la Fludarabina potenzia l'effetto citotossico dell'Ara-C;

Gli obiettivi principali degli studi clinici includenti la Fludarabina nella terapia di induzione delle LAM erano:

- incrementare il rate e la durata delle RC;
- aumentare l'efficacia della terapia di induzione nel gruppo dei pazienti MDR-positivi;
- ridurre la tossicità d'organo;
- permettere, a quanti più pazienti possibili, di accedere a programmi di intensificazione della terapia basati sul trapianto autologo o allogenico di cellule staminali emopoietiche.

I risultati dei protocolli AML 97 (66), AML 99 (67) e AML 02 hanno mostrato che FLAI è regime efficiente, in grado di indurre, da solo, la RC nel 71 - 74 % dei pazienti con LAM alla diagnosi e di età inferiore a 65 anni. Contemporaneamente, il FLAI è risultato un regime di induzione relativamente poco tossico, dato il basso numero di decessi in induzione e la ridotta frequenza e severità degli effetti collaterali, con particolare riferimento a quelli riguardanti il tratto gastroenterico. Inoltre, i risultati dello studio multicentrico randomizzato AML 99

hanno mostrato che il FLAI è superiore all'ICE nell'indurre la RC (74% vs 51%; $p=0.01$) e significativamente meno tossico sia da un punto di vista ematologico che extraematologico.

Per quanto riguarda l'ipotesi che la Fluda possa incrementare il rischio di infezioni batteriche e fungine nei pazienti con LAM, l'analisi retrospettiva condotta sulla casistica di 224 pazienti consecutivamente trattati con regimi di induzione includenti Fluda, ha contribuito a chiarire che questo farmaco non determina un aumentato rischio infettivo in questi pazienti. In particolare, l'incidenza di infezioni microbiologicamente documentate durante l'induzione è risultata pari al 39%, con una incidenza di IFI probabili/certe del 4% (Tabella 13). Questo dato si confronta con quanto riportato in letteratura in casistiche storiche, relative a pazienti trattati con regimi di induzione convenzionali, nelle quali l'incidenza di infezioni microbiologicamente documentate varia dal 36% ad oltre il 70% (83 – 86). In particolare, nella nostra casistica, l'incidenza delle IFI dopo induzione e primo consolidamento si attesta al 7% (15 episodi/224 pazienti). Questo dato appare non certamente superiore all'incidenza del 12%, riportata in uno dei più recenti e vasti studi italiani, durante l'intero programma terapeutico, con l'esclusione delle procedure trapiantologiche (74) e si confronta con l'8% riportato in uno studio francese del 2002 (87). Alla base di questa relativa ridotta incidenza di IFI si può pensare che sia

coinvolta la bassa tossicità ematologica (durata della neutropenia) ed extra-ematologica (mucosite) osservata con il FLAI/FLAIE. Questo studio retrospettivo ha contribuito, inoltre, a chiarire un altro punto fondamentale, e cioè che l'impiego di Fluda durante l'induzione non sembra incrementare il rischio di infezioni durante il primo consolidamento (Tabella 14). L'unica differenza significativa osservata rispetto all'induzione, è stata, infatti, l'incidenza di FUO, comprensibilmente più elevata in induzione (65% vs 35%; $p < 0.0001$). L'analisi separata delle complicanze infettive nei quattro diversi tipi di consolidamenti (FLAI-3, MEC-4, HD-AC, Ida-HD-AC) ha mostrato solamente un'incidenza di FUO maggiore nei consolidamenti contenenti Ara-C ad alte dosi ed una incidenza di IFI possibili/probabili/certe minore nei pazienti trattati con FLAI-3 (0% vs 7%; $p = n.s.$). Quest'ultimo dato, anche se non statisticamente significativo, potrebbe essere correlato alla breve durata della neutropenia nei 47 pazienti consolidati con FLAI-3, rispetto ai 167 pazienti consolidati con regimi non includenti Fluda (12 gg [range 10-20] vs 22 giorni [range 15 – 36]).

Per quanto concerne l'efficacia del FLAI nei pazienti MDR-Pgp positivi, già lo studio AML 97 aveva suggerito che il FLAI fosse ugualmente efficace nei pazienti iperesprimenti la Pgp rispetto a quelli ipo-esprimenti la Pgp. E' interessante notare che, nell'ambito del protocollo AML 99, restringendo l'analisi ai pazienti per i quali era

disponibile il dato dell'espressione della Pgp, si osservava un trend verso una migliore risposta e sopravvivenza dei pazienti MDR-Pgp positivi trattati con FLAI, rispetto a quelli trattati con ICE. Questo dato potrebbe essere interpretato come una migliore efficacia della combinazione includente Fludarabina nel gruppo di pazienti che potrebbero risultare primariamente resistenti alla chemioterapia convenzionale.

L'aggiunta di un quarto farmaco (Etoposide) alla combinazione del FLAI nel protocollo AML 02 è stata motivata dal desiderio di incrementare il numero di RC dopo un solo ciclo di terapia di induzione. I risultati di questo studio suggeriscono che la percentuale di RC non sia inferiore al 70-72% registrato negli studi precedenti, e che l'aggiunta dell' Etoposide possa determinare un lieve aumento della tossicità sia ematologia che extra-ematologica, senza aumentare significativamente il numero di pazienti responsivi.

Con l'obiettivo di valutare l'efficacia del FLAI nei pazienti iperesprimenti la Pgp, rispetto a quelli non iperesprimenti la Pgp, abbiamo analizzato i dati relativi a 106 pazienti, consecutivamente trattati con FLAI / FLAIE nei protocolli clinici AML 97, AML 99 e AML 02, per i quali erano disponibili tutti i dati clinici (età al momento della diagnosi e sesso) e biologici (numero di leucociti, cariotipo, espressione della Pgp), nonché un follow up adeguato di almeno 24 mesi, per eseguire una analisi statisticamente accurata. Questi 106 casi

sono stati accoppiati, in uno studio caso-controllo, a 106 pazienti (controlli), trattati in induzione con un regime convenzionale, non includente Fluda. Come già descritto in precedenza, non si sono osservate differenze in termini di RC, DDI e NR per i pazienti MDR-Pgp positivi rispetto a quelli MDR-Pgp negativi, trattati con FLAI/FLAIE. Questo non è avvenuto per i pazienti trattati con regimi convenzionali, nei quali il rate di RC, DDI e NR è risultato significativamente più sfavorevole nei MDR-Pgp positivi vs MDR-Pgp negativi (Tabella 7, $p=0.03$). Questi risultati si sono tradotti in un OS e DFS significativamente migliori quando, nei pazienti MDR-Pgp positivi è stato impiegato un regime di induzione includente Fluda (Figure 9 e 10). L'analisi univariata e multivariata ha confermato il peso prognostico negativo dell'iperespressione della Pgp (Tabelle 9 e 10).

L'esperienza clinica sull'impiego della Fludarabina nella terapia di induzione delle LAM ha contribuito, a nostro avviso, a confermare che esiste teoricamente un regime di induzione in grado di superare la farmacoresistenza MDR-Pgp mediata. Questa osservazione deriva, in particolare, dal dato di efficacia del FLAI nel sottogruppo di pazienti a fenotipo MDR-Pgp positivo che è risultata sovrapponibile a quella riscontrata nel sottogruppo di pazienti a fenotipo MDR-Pgp negativo. Questi risultati meritano di essere approfonditi con ulteriori studi prospettici, su un maggior numero di pazienti. Quello che ci sembra

importante sottolineare è che gli studi clinici futuri, indirizzati alla definizione dei fattori prognostici delle LAM alla luce delle diverse terapie di induzione, dovranno necessariamente includere nel pannello di valutazione basale di un paziente con LAM, lo studio del fenotipo MDR. I risultati della nostra esperienza, confermati anche da altri lavori presenti in letteratura, suggeriscono, infatti, che il fenotipo MDR-Pgp potrebbe aiutare ad ottimizzare la stratificazione dei pazienti in gruppi di rischio ben definiti e, soprattutto nei pazienti a cariotipo normale, aiutare il clinico a scegliere la migliore strategia terapeutica. Tutto questo si rivela di grande attualità nel campo della terapia delle LAM. L'efficacia sia dei farmaci tradizionali, da soli o in combinazione con anticorpi monoclonali (anti CD33) (88, 89) sia dei nuovi farmaci target molecolari (90, 91) sembra, infatti, influenzata dall'attività della Pgp. In particolare, alcune di queste nuove molecole (imatinib e altri inibitori delle tirosin-chinasi) sono ora disponibili in clinica e l'effetto dell'attività della Pgp sul loro metabolismo necessita di ulteriori studi.

5. BIBLIOGRAFIA

1. Tura S. Lezioni di Ematologia. *Esculapio*, **2003**
2. Vardiman JW, Harris NL. The world Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*, **2002**; 100(7):2292-302.
3. Bennet JM, Catovsky D. Proposals for the Classification of Acute Leukemias. *British Journal of Haematology*, **1976**; 33:451-457.
4. Biondi A, Rambaldi A, Alcalay M, Pandolci PP, Lo Coco F, Diverio D, Rossi V. RAR α Gene Rearrangement as a genetic Marker for Diagnosis and Monitoring in Acute Promyelocytic Leukemia. *Blood*, **1991**; 77:1418-1422.
5. Chen GO, Shen ZX. Pharmacokinetics and efficacy of low-dose all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, **1996**; 10:825-828.
6. Visani G, Bernasconi P, Boni M, Tura S. The prognostic value of cytogenetics is reinforced by the kind of induction/consolidation therapy in influencing the outcome of acute myeloid Leukemia-analysis of 848 patients. *Leukemia*, **2001**; 15(6): 903-909.

7. Mandelli F, Petti MC and Lo Coco F. Therapy of acute myeloid leukemia: towards a patient oriented risk-adapted approach. *Haematologica*, **1998**; 83(11):1015-1023.
8. Bloomfield CD, Baer MR, Herzig GP. Recent advances in curing de novo acute myeloid leukemia. *Cancer Chemotherapy*, **1995**; 10:63-72.
9. Reiffers J, Huguert F, Stoppa AM, Molina L. A prospective randomized trial of iradubicin vs daunorubicin in combination chemotherapy for acute myelogenous leukemia of the age group 55 to 75. *Leukemia*, **1996**; 10(3): 389-395.
10. Preisler HD, Raza A, Barcos M, Azarnia N. High-dose cytosine arabinoside as the initial treatment of poor-risk patients with acute non lymphocytic leukemia: A Leukemia Intergroup study. *J Clin Oncol*, **1987**; 5:75.
11. Wiernik PH, Banks PL, Case DC. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **1992**; 79:2, 313.
12. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA et al. Intensive postremission chemotherapy in adults with acute myeloid leukemia. *New Engl J of Med*, **1994**; 331:896-903.

13. Dillman RO, Davis RB, Green MR, Weiss RB. A comparative study of two different doses of cytarabine for acute myeloid leukemia: a phase III trial of Cancer and Leukemia Group B. *Blood*, **1991**; 78:2520-2526.
14. Weick J, Kopecky J, Appelbaum F. A randomized investigation of high dose versus standard dose cytosine arabinoside with daunorubicin in patients with acute myelogenous leukemia. *Proc. Am Soc. Clin. Onc.*, **1992**; 11:261.
15. Bishop JF, Matthews JP, Young GA, Szer J. A randomized study of high dose cytarabine in induction in acute myeloid leukemia. *Blood*, **1996**; 87:1710.
16. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. *N Engl J Med*, **1995**; 332:217.
17. Korbling M, Flidner TM, Holle R, et al. Autologous blood stem cell (ABSCT) versus purged bone marrow transplantation (pABMT) in standard risk AML: influence of source and cell composition of the autograft on hemopoietic reconstitution and disease free survival. *Bone Marrow Transplant*, **1991**; 7:343.
18. Mihich E, Baker RM. Molecular mechanisms of resistance to anticancer drugs. *FORUM 4*, **1994**; 290-304.

19. Russo D, Marie JP, Zhou DC et al. Coexpression of anionic glutathione-s-transferase (GST) and multidrug resistance (MDRL) genes in acute myeloid and lymphoid leukemias. *Leukemia*, **1994**; 8:881-884.
20. Paul VW, Lenneth DT et al. Mechanism of drug resistance in neoplastic cells. *Accademic Press Inc New York*, **1988**.
21. Micheli M, Michelutti A, Damiani D et al. A comparative analysis of the sensitivity of multidrug resistant (MDR) and non MDR cell to different anthracycline derivats. *Leukemia and Lymphoma*, **1993**; 9:255-264.
22. Michieli MG, Damiani D, Ermacora A, Raspadori D, Michelutti A. P-glycoprotein and lung resistance-related protein (LRP) expression and function in leukaemic blasts cells. *British Journal of Haematology*, **1997**; 96:356-365.
23. Kantarjian HM, Estey EH, Keating MA. New chemotherapeutic agents in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **1996**; 10 (Suppl 1): 4-6.
24. Russo D, Marie JP, Delmer A, Zhou DC. DNA topoisomerase I and II: biologic features and their role in Drug Resistance. *Haematologica*, **1993**; 78:201-207.
25. Russo D, Marie JP, Zhou DC, Faussat AM. Evaluation of the Clinical Relevance of the Anionic Glutathione-S-Transferase

- (GST) and Multidrug Resistance (MDR-1) Gene coexpression in Leukemias and Lymphomas. *Leukemia and Lymphoma*, **1994**; 15:453-468.
- 26.Senent L, Jarque I, Martin G, Sempere A. P-glycoprotein expression and prognostic value in acute myeloid leukemia. *Haematologica*, **1998**; 83(9): 783-7.
- 27.Wood P, Burgess R, MacGregor A, Yin JA P-glycoprotein expression on acute myeloid leukaemia blast cells at diagnosis predicts response to chemotherapy and survival. *Br J Haematol*. **1994**;87:509-14.
- 28.Del Poeta G, Stasi R, Aronica G, Venditti A, Cox MC, Bruno A, Buccisano F, Masi M, Tribalto M, Amadori S, Papa G. Clinical relevance of P-glycoprotein expression in de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. **1996**;87:1997-2004.
- 29.Li J, Xia X, Hua D, Wang W, Chen Z, Ruan C Clinical and biological relevance of flow cytometric determination of P-glycoprotein expression in acute non-lymphocytic leukemia. *Chin Med J (Engl)*. **1997**;110:919-22.
- 30.Filipits M, Pohl G, Stranzl T, Suchomel RW, Scheper RJ, Jager U, Geissler K, Lechner K, Pirker R. Expression of the lung resistance protein predicts poor outcome in de novo acute myeloid leukemia. *Blood*. **1998**;91:1508-13.

31. Del Poeta G, Venditti A, Stasi R, Aronica G, Cox MC, Buccisano F, Tamburini A, Bruno A, Maurillo L, Battaglia A, Suppo G, Epiceno AM, Del Moro B, Masi M, Amadori S, Papa G. P-glycoprotein and terminal transferase expression identify prognostic subsets within cytogenetic risk classes in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* **1999**;23:451-65.
32. Leith CP, Kopecky KJ, Chen IM, Eijdem L, Slovak ML, McConnell TS, Head DR, Weick J, Grever MR, Appelbaum FR, Willman CL. Frequency and clinical significance of the expression of the multidrug resistance proteins MDR1/P-glycoprotein, MRP1, and LRP in acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group Study. *Blood.* **1999** 1;94:1086-99.
33. Tothova E, Elbertova A, Fricova M, Kafkova A, Hlebaskova M, Svorcova E, Stecova N, Guman T, Raffac S. P-glycoprotein expression in adult acute myeloid leukemia: correlation with induction treatment outcome. *Neoplasma.* **2001**;48:393-7.
34. Kasimir-Bauer S, Beelen D, Flasshove M, Noppeney R, Seeber S, Scheulen ME. Impact of the expression of P glycoprotein, the multidrug resistance-related protein, bcl-2, mutant p53, and heat shock protein 27 on response to induction therapy and long-term survival in patients with de novo acute myeloid leukemia. *Exp Hematol.* **2002**;30:1302-8.

35. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Chaoui D, Marie JP, Legrand O. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res.* **2004**;10:7896-902.
36. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Tang R, Chaoui D, Morjani H, Marzac C, Marie JP, Legrand O. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* **2005**;11:7764-72.
37. Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, Geromin A, Chiarvesio A, Michelutti A, Cavallin M, Fanin R. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica.* **2006**;91:825-8.
38. Malagola M, Damiani D, Martinelli G, Michelutti A, Cesana B, De Vivo A, Piccaluga PP, Candoni A, Geromin A, Tiribelli M, Fanin R, Testoni N, Lauria F, Bocchia M, Gobbi M, Pierri I, Zaccaria A, Zuffa E, Mazza P, Piccolo G, Gugliotta L, Bovini B, Visani G, Skert C, Bergonzi C, Roccaro AM, Fili C, Baccarani M, Russo D. Case-control study of MDR phenotype and response to induction treatment including or not fludarabine in newly diagnosed acute myeloid leukaemia patients. *Brit J Haematol.* **2006**: in press.

39. Kim DH, Lee NY, Baek JH, Kim JG, Sohn SK, Suh JS, Lee KS, Lee KB. Prognostic scoring model based on multi-drug resistance status and cytogenetics in adult patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. **2006**;47(3):461-7.
40. Michieli M, Damiani D, Michielutti A, Melli C, Russo D. P 170 dependent multidrug resistance. Restoring full sensitivity to Idarubicin with Verapamil and Ciclosporin A derivatives. *Haematologica*, **1994**; 79:119-126.
41. Michieli M, Damiani D, Michielutti A, Candoni A. Restoring uptake and retention of daunorubicin and idarubicin in P170-related multidrug resistance cells by low concentration D-Verapamil, Cyclosporin-A and SDZ PSC 833 *Haematologica*, **1994**; 79:500-507.
42. Yang GS, Minden MD, McCulloch EA. Regulation by retinoic acid and hydrocortisone of the anthracycline sensitivity of blast cells of acute myeloblastic leukemia. *Leukemia*, **1994**; 8:2065-2075.
43. Visani G, Milligan D, Leoni F, Chang J. Combined action of PSC 833 (Valspodar), a novel MDR reversing agent with mitoxantrone, etoposide and cytarabine in poor-prognosis acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **2001**; 15(5):764-71.

44. Fanin R, Damiani D, Michieli M, Cerno M. Cyclosporine A plus chemotherapy in acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology*, **1999**; 22(8):761.
45. Van der Holt B, Lowenberg B, Burnett AK, Knauf WU, Shepherd J. The value of the MDR1 reversal agent PSC-833 in addition to daunorubicin and cytarabine in the treatment of elderly patients with previously untreated acute myeloid leukemia (AML), in relation to MDR1 status at diagnosis. *Blood*, **2005**; 106(8).
46. Michielutti A, Michieli M, Damiani D, Melli C. Effect of fludarabine and arabinosyl-cytosine on multidrug resistant cells. *Haematologica*, **1997**; 82:143-147.
47. Zinzani P.L., Buzzi M., Farabegoli P., Tosi P., Fortuna A. Induction of “in vitro” apoptosis by fludarabine in freshly isolated B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Leuk Lymphoma*, **1994**; 13(1-2):95-7.
48. Zinzani PL, Lauria F, Rondelli D, Benfenati D, Raspadori D. Fludarabine in patients with advanced and/or resistant B-chronic lymphocytic leukemia. *Eur J Haematol*, **1993**; 51(2): 93-7.
49. Zinzani PL, Magagnoli M, Bendandi M, Gherlinzoni F, Orcioni GF. Efficacy of fludarabine and mitoxandrone (FN) combination regimen in untreated indolent non-Hodgkin’s lymphomas. *Ann Oncol*, **2000**; 11:363-5.

50. Michallet M, Bilger K, Garban F. Allogeneic hematopoietic stem cell transplant after immune-ablative preparative regimen. A report of 92 cases. *Blood*, **1999**; 94(10, suppl): 348a.
51. Grigg A, Seymour JF, Roberts A et al. Mini allo-grafts for hematological malignancies: an alternative to conventional myeloablative marrow transplantation. *Aust MZ J Med*, **1999**; 29:308-14.
52. Davis CJ, Fessler BJ, Tassiulas I, Yarboro CH. High dose versus low dose fludarabine in the treatment of patients with severe refractory reumathoid arthritis. *J Reunathol*, **1998**; 25:1694-1704.
53. Smith OP, Hoffbrand AV, Buckley C. Fludarabine and psoriasis. *New Engl J Med*, **1994**; 330:1540-1.
54. Estey E., Plunkett W., Gandhi V., Rios M.B. Fludarabine and arabinosylectosine therapy of refractory and relapsed acute myelogenous leukemia. *Leuk Lymphoma*, **1993**; 9:343-50.
55. Cooper BW, Veal GJ, Radivoyevitch T, Tilby MJ, Meyerson HJ, Lazarus HM, Koc ON, Creger RJ, Pearson G, Nowell GM, Gosky D, Ingalls ST, Hoppel CL, Gerson SL. A phase I and pharmacodynamic study of fludarabine, carboplatin, and topotecan in patients with relapsed, refractory, or high-risk acute leukemia. *Clin Cancer Res* **2004**; 10:6830-9.

56. Clavio M, Venturino C, Pierri I, Garrone A, Miglino M, Canepa L, Balleari E, Balocco M, Michelis GL, Ballerini F, Gobbi M. Combination of liposomal daunorubicin (DaunoXome), fludarabine, and cytarabine (FLAD) in patients with poor-risk acute leukemia. *Ann Hematol* **2004**; 83:696-703.
57. Giles FJ, Cortes JE, Kantarjian HM, O'Brien SM, Estey E, Beran M. A fludarabine, topotecan, and cytarabine regimen is active in patients with refractory acute myelogenous leukemia. *Leuk Res* **2004**; 28:353-7.
58. Pastore D, Specchia G, Carluccio P, Liso A, Mestice A, Rizzi R, Greco G, Buquicchio C, Liso V. FLAG-IDA in the treatment of refractory/relapsed acute myeloid leukemia: single-center experience. *Ann Hematol* **2003**; 82:231-5.
59. Kern W, Schleyer E, Braess J, Wittmer E, Ohnesorge J, Unterhalt M, Wormann B, Buchner T, Hiddemann W. Efficacy of fludarabine, intermittent sequential high-dose cytosine arabinoside, and mitoxantrone (FIS-HAM) salvage therapy in highly resistant acute leukemias. *Ann Hematol* **2001**; 80:334-9.
60. Plunkett W, Huang P, Gandhi V. Metabolism and action of fludarabine phosphate. *Semin. Oncol.*, **1990**; 17:3-17.
61. Gandhi V, Estey E, Keating M.J, et al. Synergistic combination of fludarabine and ara-C for AML therapy. *Blood*, **1991**; 78:52a.

62. Seymour JF, Peng H, Plunkett W, Gandhi V. Influence of Fludarabine on Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Cytarabine: Implications for a Continuous Infusion Schedule. *Clinical Cancer Research*, **1996**; 2:653-658.
63. Feldman E, Gandhi V, Plunkett W, et al. Sequential administration of fludarabine, ara-C and mitoxantrone enhances topoisomerase II-DNA complex formation and has efficacy in acute leukemia. *Blood*, **1992**; 80:208(a).
64. Tosi P, Visani G, Ottaviani E, Manfroi ., Zinzani PL, Tura S. Fludarabine + araC + G-CSF: cytotoxic effect and induction of apoptosis on fresh acute myeloid leukemia cells. *Leukemia*, **1994**; 8:2076-82.
65. Ghandi V, Estey E, Du M, Nowak B, Keating MJ, Plunkett W. Modulation of the cellular metabolism of cytarabine and fludarabine by granulocyte colony stimulating factor during therapy of acute myelogenous leukemia. *Clin Cancer Res.*, **1995**; 1:169-78.
66. Russo D., Pricolo G., Michieli M., Michielutti A., Raspadori D. Fludarabine, arabinosyl cytosine and idarubicin (FLAI) for remission induction in poor-risk acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **2001**; 40:335-43.

67. Russo D, Malagola M, de Vivo A, Fiacchini M, Martinelli G, Piccaluga PP, Damiani D, Candoni A, Michielutti A, Castelli M, Testoni N, Ottaviani E, Rondoni M, Pricolo G, Mazza P, Zuffa E, Zaccaria A, Raspadori D, Bocchia M, Lauria F, Bonini A, Avanzini P, Gugliotta L, Visani G, Fanin R, Baccarani M. Multicentre phase III trial on fludarabine, cytarabine (Ara-C), and idarubicin versus idarubicin, Ara-C and etoposide for induction treatment of younger, newly diagnosed acute myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* **2005**; 131:172-9.
68. Russo D, Damiani D, Malagola M, De Vivo A, Fiacchini M, Martinelli G, Piccaluga PP, Candoni A, Michelutti A, Fanin R, Castelli M, Teston N, Ottavini E, Rondoni M, Pericolo G, Mazza M, Zuffa E, Zaccaria A, Raspadori D, Bocchia M, Lauria F, Bovini B, Avanzino P, Gugliotta L, Pierri I, Gobbi M, Visani G, Baccarani M. Fludarabine Based Regimen (FLAI) Is an Effective Treatment for Induction of Multidrug Resistant Pgp-Positive Acute Myeloid Leukemia Patients. *Blood* 106 (suppl 11 *ASH* 2005): 1857.
69. Sanders C, Perez EA, Lawrence HJ. Opportunistic infections in patients with chronic lymphocytic leukaemia following treatment with fludarabine. *American Journal of Haematology* **1992**; 39:14-5.

- 70.Fenchel K, Bergmann L, Wijermans P, Engert A, Pralle H, Mitrou PS, Diehl V, Hoelzer D. Clinical experience with fludarabine and its immunosuppressive effects in pretreated chronic lymphocytic leukemias and low-grade lymphomas. *Leukemia & Lymphoma* **1995**; 18:485-92.
- 71.Anaissie E, Kotoyiannis D, O'Brien S, Kantarjian H, Robertson L, Lerner S, Keating M. Infections in patients with chronic lymphocytic leukemia treated with fludarabine. *Annals of Internal Medicine* **1998**; 129:559-66.
- 72.Morrison VA. The infectious complications of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars Oncology* **1998**; 25:98-106.
- 73.Pagano L, Girmenia C, Mele L, Ricci P, Tosti ME, Nosari A, Buelli M, Picardi M, Allione B, Corvatta L, D'Antonio D, Montillo M, Melillo L, Chierichini A, Cenacchi A, Tonso A, Cudillo L, Candoni A, Savignano C, Bonini A, Martino P, Del Favero A. Infections caused by filamentous fungi in patients with hematologic malignancies. A report of 391 cases by GIMEMA Infection Program. *Haematologica* **2001**; 86:862-70.
- 74.Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, Pastore D, Picardi M, Bonini A, Chierichini A, Fanci R, Caramatti C, Invernizzi R, Mattei D, Mitra ME, Melillo L, Aversa F, Van Lint MT, Falcucci P, Valentini CG, Girmenia C, Nosari A. The

epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica* **2006**; 91:1068-75.

75. Pagano L, Caira M, Picardi M, Candoni A, Melillo L, Fianchi L, Offidani M, Nosari. Invasive Aspergillosis in patients with acute leukemia: update on morbidity and mortality--SEIFEM-C Report. *Clinical Infectious Disease* **2007**;44:1524-5.

76. Asciglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille F, Crokaert F, Denning DW, Donnelly JP, Edwards JE, Erjavec Z, Fiere D, Lortholary O, Maertens J, Meis JF, Patterson TF, Ritter J, Selleslag D, Shah PM, Stevens DA, Walsh TJ. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clinical Infectious Disease* **2002**;34:7-14.

77. De Pauw B, Patterson TF. Should the consensus guidelines' specific criteria for the diagnosis of invasive fungal infection be changed?. *Clinical Infectious Disease* **2005**;41:S377-80.

78. Caillot D, Couaillier JF, Bernard A, Casasnovas O, Denning DW, Mannone L, Lopez J, Couillault G, Piard F, Vagner O, Guy H. Increasing volume and changing characteristics of invasive pulmonary aspergillosis on sequential thoracic computed

- tomography scans in patients with neutropenia. *Journal of Clinical Oncology* **2001**, 19:253-259.
79. Maertens J, Theunissen K, Verhoef G, Verschakelen J, Lagrou K, Verbeken E, Wilmer A, Verhaegen J, Boogaerts M, Van Eldere J. Galactomannan and computed tomography-based preemptive antifungal therapy in neutropenic patients at high risk for invasive fungal infection: a prospective feasibility study. *Clinical Infectious Disease* **2005**, 41: 1242-50
80. Hann IM, Stevens RF, Goldstone AH, Rees JK, Wheatley K, Gray RG, Burnett AK. Randomized comparison of DAT vs ADE as induction chemotherapy in children and young adults with acute myeloid leukaemia. Results of the Medical Research Council's 10th AML trials (AML MRC 10). *Blood* **1997**; 89:2311-8.
81. De Witte T, Suci S, Zittoun R, Resegotti L, Liso V, Willemze R, Belhabri A, Amadori S, Giustolisi R, Labar B, Fioritoni G, Rossi-Ferrini G, Leone G, Jehn U, Keating S, Fazi P, Rodts P, Solbu G, Mandelli F. The type of anthracycline administered during remission induction and consolidation therapy of AML has an impact on feasibility of subsequent autologous or allogeneic transplantation and induced marrow toxicity: preliminary results of the EORTC-GIMEMA AML-10 randomized trial. *Blood*, **2000** Abs n°2167:503.

82. Suci S, Mandelli F, de Witte T, Zittoun R, Gallo E, Labar B, De Rosa G, Belhabri A, Giustolisi R, Delarue R, Liso V, Mirto S, Leone G, Bourhis JH, Fioritoni G, Jehn U, Amadori S, Fazi P, Hagemeijer A, Willemze R; EORTC and GIMEMA Leukemia Groups. Allogeneic compared with autologous stem cell transplantation in the treatment of patients younger than 46 years with acute myeloid leukemia in first complete remission: an intention to treat analysis of the EORTC/GIMEMA AML-10 trial. *Blood*, **2003**; 102:1232-40
83. Zittoun R, Suci S, Mandelli F, de Witte T, Thaler J, Stryckmans P, Hayat M, Peetermans M, Cadiou M, Solbu G, Petti MC, Willemze R. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor associated with induction treatment of acute myelogenous leukaemia: a randomized trial by the European Organization for Research and Treatment of Cancer and Leukemia Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology* **1996**; 14:2150-59.
84. Heil G, Hoelzer D, Sanz MA, Lechner K, Liu Yin J, Papa G, Noens L, Szer J, Ganser A, O'Brien C, Matcham J, Barge A. A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III study of filgrastim in remission induction and consolidation therapy for adults with de novo acute myeloid leukemia. *Blood* **1997**;90:4710-18.

85. Witz F, Sadoun A, Perrin MC, Berthou C, Briere J, Cahn JY, Lioure B, Witz B, Francois S, Desablens B, Pignon B, Le Prisè P, Audhuy A, Caillot D, Casassus P, Delain M, Christian B, Tellier Z, Polin V, Hurteloup P, Harousseau J. A placebo-controlled study of recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor administered during and after induction treatment for de novo acute myelogenous leukaemia in elderly patients. *Blood* **1998**; 91:2722-30.
86. Godwin JE, Kopecky JK, Head DR, Willman C, Leith C, Hynes H, Balcerzak S, Appelbaum F. A double-blind placebo-controlled trial of granulocyte colony-stimulating factor in elderly patients with previously untreated acute myeloid leukaemia: a Southwest Oncology Group Study (9031). *Blood* **1998**;91:3607-15.
87. Cornet M, Fleury L, Maslo C, Bernard JF, Brucker G. Epidemiology of invasive aspergillosis in France: a six-year multicentric survey in the Greater Paris area. Invasive Aspergillosis Surveillance Network of the Assistance Publique-Hopitaux de Paris. *Journal of Hospital Infections* **2002**;51:288-96.
88. Walter RB, Raden BW, Hong TC, Flowers DA, Bernstein ID, Linenberger ML. Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood* **2003**; 102:1466-73.

89. Matsui H, Takeshita A, Naito K, Shinjo K, Shigeno K, Maekawa M, Yamakawa Y, Tanimoto M, Kobayashi M, Ohnishi K, Ohno R. Reduced effect of gemtuzumab ozogamicin (CMA-676) on P-glycoprotein and/or CD34-positive leukemia cells and its restoration by multidrug resistance modifiers. *Leucemia* **2002**; 16:813-9.
90. Illmer T, Schaich M, Platzbecker U, Freiberg-Richter J, Oelschlagel U, von Bonin M, Pursche S, Bergemann T, Ehninger G, Schleyer E (2004). P-glycoprotein-mediated drug efflux is a resistance mechanism of chronic myelogenous leukemia cells to treatment with imatinib mesylate. *Leukemia* **2004**; 18:401-8.
91. Burger H, van Tol H, Brok M, Wiemer EA, de Bruijn EA, Guetens G, de Boeck G, Sparreboom A, Verweij J, Nooter K. Chronic imatinib mesylate exposure leads to reduced intracellular drug accumulation by induction of the ABCG2 (BCRP) and ABCB1 (MDR1) drug transport pumps. *Cancer Biology and Therapy* **2005**; 4:747-52.

Tabella 1: La Classificazione FAB delle LAM

	Frequenza (%)	Morfologia	Citochimica	Immunofenotipo di Membrana
M1 Mieloblastica senza maturazione	18	CB (tipo I e II) > 90%	Perossidasi o Sudan B (> 3% CB +)	CD13, CD33, MPO7, (CD14)
M2 Mieloblastica con maturazione	35	CB (tipo I e II) < 90%; PMC, MC, MMC e PMN > 10%; Mo < 20%	Perossidasi o Sudan B (> 20% CB +)	CD13, CD33, MPO7
M3 Promielocitica: - Tipica - Microgranulare	9 1	CB ipergranulate tipo PMC con numerosi bastoncini di Auer CB con nuclei fogliacei bi-multi lobati, con fini granuli. Rare CB ipergranulate	Perossidasi o Sudan B	CD13, CD33, MPO7
M4 Mielomonoblastica	20	CB (tipo I e II) e altre cellule granulocitarie più mature < 80%	Perossidasi o Sudan B Nasde NaF parzialmente resistenti, Anae	CD13, CD33, CD14
M5 Monoblastica M5a-senza maturazione M5b-con maturazione	7 6	Monoblasti > 80% Monoblasti, promonociti e Mo > 80%	Nasde NaF sensibili, Anae	CD14, CD13, CD33
M6 Eritroblastica	3	EB > 50% e CB (tipo I e II) > 30% delle cellule non eritroidi	Pas (EB) Perossidasi o Sudan B	CD42
M7 Megacarioblastica	1	CB (tipo I e tipo linfoide) > 30%; fibrosi marcata	Per ossidasi piastrinica	CD41

I blasti tipo I e tipo II sono caratterizzati rispettivamente da assenza e presenza di granulazioni citoplasmatiche. Per la citochimica e per l'immunofenotipo di membrana sono elencati gli elementi più comuni e più utili per la diagnosi

Tabella 2: Classificazione WHO delle LAM

1. Leucemia acuta mieloide con anomalie genetiche ricorrenti
 - Leucemia acuta mieloide con t(8;21)(q22;q22) (AML1/ETO)
 - Leucemia acuta mieloide con eosinofilia del midollo osseo e inv(16)(p13q22) o t(16;16)(q13;q22), (CBF β /MYH11)
 - Leucemia acuta promielocitica con t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR α) e varianti
 - Leucemia acuta mieloide con anomalie delle bande 11q23 (MLL)
2. Leucemia acuta mieloide con displasia multilineare
 - Secondaria a mielodisplasia (MDS) o MDS / sindrome mieloproliferativa (SM)
 - Senza antecedenti MDS o MDS/MPD, ma con displasia in almeno nel 50% delle cellule di 2 o più linee mielodi
3. Leucemia acuta mieloide e sindromi mielodisplastiche, correlate alla TX con:
 - Agenti alchilanti o radiazioni
 - Inibitori della topoisomerasi II
 - Altri
4. Leucemia acuta mieloide (non altrimenti definita):
 - Leucemia acuta mieloide, variamente differenziata
 - Leucemia acuta mieloide senza maturazione
 - Leucemia acuta mieloide con maturazione
 - Leucemia acuta mielomonocitica
 - Leucemia acuta monoblastica / acuta monocitica
 - Leucemia acuta eritroide
 - Leucemia acuta megacarioblastica
 - Leucemia acuta basofila
 - Panmielosi acuta con mielofibrosi
 - Sarcoma mieloide

Tabella 3. Impatto dell'MDR-Pgp su RC, OS e DFS nei pazienti con LAM di nuova diagnosi.

Autore	Pazienti	MDR Pgp +	Outcome		
			RC	DFS	OS
Wood '94	54	55%	60%	< / 9 mesi	< / 11 mesi
Del Poeta '96	158	43%	31%	NR	NR
Li '97	152	29%	23%	NR	NR
Michieli '97	65	35%	40%	< / 10 mesi	< / 12 mesi
Senent '98	82	33%	30%	NR	NR
Filipitis '98	86	36%	55%	< / 8 mesi	< / 9 mesi
Del Poeta '99	204	58%	40%	NR	NR
Leith '99	352	35%	NR	NR	NR
Tothova '01	31	45%	35%	< / 6 mesi	NR
Kasmir-Bauer '02	124	40%	NR	< / 24% @ 3 aa	NR
Benderra '04	149	30%	43%	< / 12% @ 4 aa	< / 19% @ 4 aa
Benderra '05	85	30%	NR	NR	NR
Damiani '06	73	33%	NR	NR	< / 30% @ 3 aa
Malagola '06	212	37%	44%	< / 18% @ 3 aa	< / 20% @ 3 aa
MEDIANA		36%	40%	<	<

Tabella 4. La Fludarabina e le sue interferenze con il metabolismo cellulare

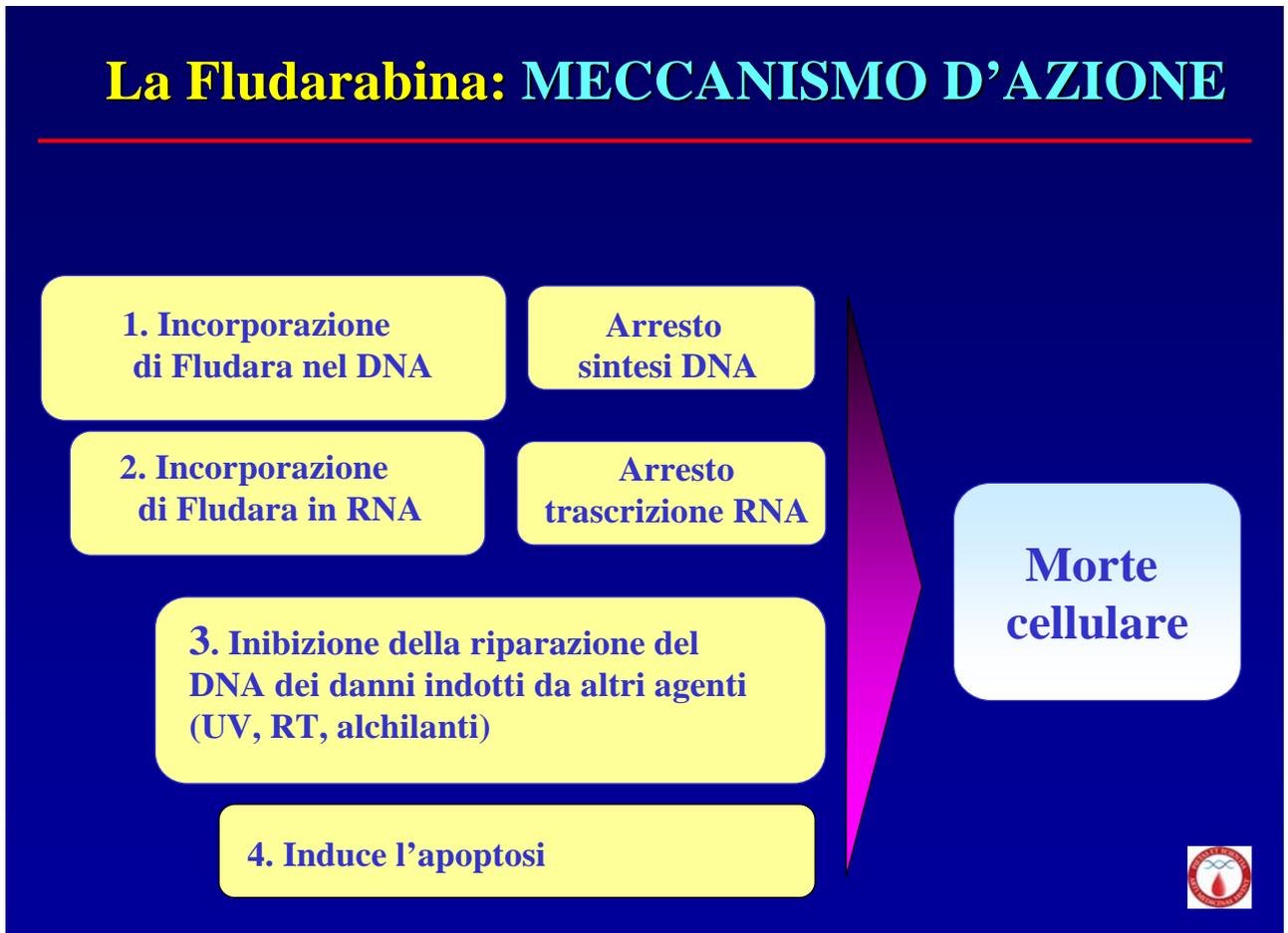


Tabella 5. Caratteristiche cliniche e biologiche di 106 pazienti di età ≤ 60 anni affetti da LAM di nuova diagnosi trattati con un regime di induzione includente Fludarabina (casi*) e di 106 pazienti affetti da LAM e trattati con un regime di induzione convenzionale (controlli), confrontati in base al fenotipo MDR-Pgp (positivi vs negativi), all'età e al cariotipo.**

	Casi* MDR-Pgp pos [#] (n=39)	Controlli** MDR-Pgp pos [#] (n=39)	P	Casi* MDR-Pgp neg ^{##} (n=67)	Controlli** MDR-Pgp neg ^{##} (n=67)	P
Sesso (M/ F)	15/24	19/20	0.36	30/37	31/36	0.86
Età media +/- DS	47.744 +/- 13.106	47.205 +/- 13.013	0.79	43.2 +/- 11.8	44.1 +/- 13.5	0.50
Età mediana (range)	52 (19 – 60)	52 (19 – 60)		43 (20 – 60)	49 (18 – 60)	
Cariotipo			1.00			1.00
<i>NORMALE</i>	14/39 (36%)	14/39 (36%)		36/67 (54%)	36/67 (54%)	
<i>SFAVOREVOLE</i> [°]	18/39 (46%)	18/39 (46%)		14/67 (21%)	14/67 (21%)	
<i>FAVOREVOLE</i> [§]	0/39 (0%)	0/39 (0%)		5/67 (7%)	5/67 (7%)	
<i>NON VALUTABILE</i>	7/39 (18%)	7/39 (18%)		12/67 (18%)	12/67 (18%)	
Citotipo FAB			0.53			0.47
<i>M 0</i>	4/39 (10%)	1/39 (3%)		7/67 (10%)	3/67 (4%)	
<i>M 1</i>	11/39 (28%)	10/39 (26%)		15/67 (22%)	14/67 (21%)	
<i>M 2</i>	6/39 (15%)	4/39 (10%)		12/67 (18%)	17/67 (25%)	
<i>M 4</i>	6/39 (15%)	7/39 (18%)		17/67 (25%)	14/67 (21%)	
<i>M 5</i>	12/39 (31%)	17/39 (44%)		13/67 (19%)	18/67 (27%)	
<i>M 6</i>	0/39 (0%)	0/39 (0%)		1/67 (2%)	1/67 (1%)	
<i>M 7</i>	0/39 (0%)	0/39 (0%)		0/67 (0%)	0/67 (0%)	
<i>Sec</i>	0/39 (0%)	0/39 (0%)		2/67 (3%)	0/67 (0%)	
Leucociti ≥ 30 x 10⁹/L	16/39 (41%)	20/39 (51%)	0.36	28/67 (42%)	29/67 (43%)	0.86
N° medio di leucociti +/- DS	50.0 +/- 72.649	51.3 +/- 57.391	0.21	43.1 +/- 61.2	43.3 +/- 60	0.23
N° mediano di leucociti (range)	18 (0.7 – 270)	30 (1.3 – 205)		10 (0.4 – 270)	20 (1 – 329)	

* Casi: 106 pazienti trattati con regime di induzione includente Fludarabina (FLAI/FLAIE)

** Controlli: 106 pazienti trattati con regime di induzione convenzionale, non includente Fludarabina (Dauno/Ida + AraC +/- Etoposide)

[#] MDR-Pgp pos = MFI ≥ 6 ^{##} MDR-Pgp neg = MFI < 6

[°] CARIOTIPO SFAVOREVOLE: anomalie dei cromosomi 5, 7, 11q23, 3, +8, cariotipo complesso

[§] CARIOTIPO FAVOREVOLE: traslocazione (8;21), inversione (16)

Tabella 6. Risposta al primo ciclo di induzione nei 106 casi* vs 106 controlli inclusi nell'analisi.**

RISPOSTA GLOBALE				
	Casi * (n=106)	Controlli ** (n=106)	P	
RC	74/106 (70%)	62/106 (59%)	0.09	0.02
NR	30/106 (28%)	33/106 (31%)	0.72	
DDI	2/106 (2%)	11/106 (10%)	0.009	

* Casi: 106 pazienti trattati con regime di induzione includente Fludarabina (FLAI/FLAIE)

** Controlli: 106 pazienti trattati con regime di induzione convenzionale, non includente Fludarabina (Dauno/Ida + AraC +/- Etoposide)

Tabella 7. Risposta alla terapia di induzione nei casi* e nei controlli, rispetto al fenotipo MDR-Pgp (Pos vs Neg).**

Casi*				Controlli**				
	MDR-Pgp pos [#] (n=39)	MDR-Pgp neg ^{##} (n=67)	P		MDR-Pgp pos [#] (n=39)	MDR-Pgp neg ^{##} (n=67)	P	
RC	24/39 (61%)	50/67 (75%)	0.16	0.36	CR	17/39 (44%)	45/67 (67%)	0.02
NR	14/39 (36%)	16/67 (24%)	0.18		NR	18/39 (46%)	15/67 (22%)	0.01
DDI	1/39 (3%)	1/67 (1%)	0.69		DDI	4/39 (10%)	7/67 (11%)	0.97

* Casi: 106 pazienti trattati con regime di induzione includente Fludarabina (FLAI/FLAIE)

** Controlli: 106 pazienti trattati con regime di induzione convenzionale, non includente Fludarabina (Dauno/Ida + AraC +/- Etoposide)

[#] MDR-Pgp pos = MFI \geq 6

^{##} MDR-Pgp neg = MFI < 6

Tabella 8. Risposta all'induzione nei pazienti ipoesprimenti la Pgp (MDR-Pgp negativi) e in quelli iperesprimenti la Pgp (MDR-Pgp positivi), rispetto alla terapia ricevuta (casi* vs controlli)**

Risposta nei pazienti MDR-Pgp negativi ^{##}				Risposta nei pazienti MDR-Pgp positivi [#]					
	Casi* (n=67)	Controlli** (n=67)	P			Casi* (n=39)	Controlli** (n=39)	P	
RC	50/67 (75%)	45/67 (67%)	0.34	0.09	CR	24/39 (61%)	17/39 (44%)	0.11	0.17
NR	16/67 (24%)	15/67 (22%)	0.84		NR	14/39 (36%)	18/39 (46%)	0.36	
DDI	1/67 (1%)	7/67 (11%)	0.03		DDI	1/39 (3%)	4/39 (10%)	0.16	

* Casi: 106 pazienti trattati con regime di induzione includente Fludarabina (FLAI/FLAIE)

** Controlli: 106 pazienti trattati con regime di induzione convenzionale, non includente Fludarabina (Dauno/Ida + AraC +/- Etoposide)

MDR-Pgp pos = MFI \geq 6

MDR-Pgp neg= MFI < 6

Tabella 9. Analisi univariata delle variabili cliniche e biologiche correlate alla RC.

Variabile	RC (%)	NR/DDI (%)	P
Sesso			
M (n=95)	56 (58.9%)	39 (41.1%)	0.15
F (n=117)	80 (68.3%)	37 (31.7%)	
Gruppo di trattamento			
Fluda (casi) (n=106)	74 (69.8%)	32 (30.2%)	0.08
Non Fluda (controlli) (n=106)	62 (58.5%)	44 (41.59%)	
Leucociti			
< 30 x 10 ⁹ /L (n=119)	80 (67.3%)	39 (32.7%)	0.29
≥ 30 x 10 ⁹ /L (n=93)	56 (60.2%)	37 (39.8%)	
Citotipo FAB			
M0-M5-M6-M7-Sec (n=79)	45 (56.9%)	34 (43.1%)	0.09
M1-M2-M4 (n=133)	91 (68.4%)	42 (31.6%)	
Fenotipo MDR			
MDR-Pgp negativi (n=134)	95 (70.9%)	39 (29.1%)	0.007
MDR-Pgp positivi (n= 78)	41 (52.6%)	37 (47.4%)	
Gruppo cariotipico noto			
Favorevole (n=10)	10 (100%)	0 (0%)	0.007
Sfavorevole (n=64)	34 (53.1%)	30 (46.9%)	
Normale (n=100)	69 (69%)	31 (31%)	

Tabella 10. Analisi multivariate delle variabili cliniche e biologiche ad impatto prognostico negativo sulla RC.

Variabili cliniche e biologiche	P	Odds Ratio	95% CI
Fenotipo MDR-Pgp Positivo vs Negativo	0.007	2.23	1.24 – 3.99
Età*	0.06	1.25	0.99 – 1.59
Gruppo di trattamento Non Fluda vs Fluda	0.08	0.59	0.34 – 1.07

* Per ogni decade di età

Tabella 11. Caratteristiche cliniche, risposta e tossicità in 224 pazienti affetti da LAM di nuova diagnosi, consecutivamente trattati con un regime di induzione includente Fluda.

	AML97 (70 pz)	AML99 (65 pz)	AML02 (89 pz)	P#	Totale (224 pz)
Caratteristiche cliniche					
M/F	36/34	37/28	45/44	n.s.	118/106
Età mediana (range)	48 (19-64)	47 (19-60)	45 (18-63)	n.s.	46 (18-64)
Risposta all'induzione*					
CR	47/70 (67%)	47/65 (72%)	63/89 (71%)	n.s.	157/224 (70%)
NR	20/70 (29%)	16/65 (25%)	21/89 (24%)	n.s.	57/224 (26%)
DDI	3/70 (4%)	2/65 (3%)	5/89 (5%)	n.s.	10/224 (4%)
N° di pazienti sottoposti al I consolidamento	67/70 (96%)	63/65 (97%)	84/89 (94%)	n.s.	214/224 (95%)
Tossicità ematologica					
ANC > 1 x 10⁹/L N° mediano di giorni (range)	24 (19-45)	25 (20-46)	28 (19-60)	n.s.	26 (19-60)
PLTs > 100 x 10⁹/L N° mediano di giorni (range)	23 (19-40)	25 (19-33)	31 (20-72)	n.s.	28 (19-72)
Tossicità extraematologica §					
Grade III – IV WHO N° episodi	6	5	10	n.s.	21

* RC = remissione completa; NR = non responsivi; DDI = decessi in induzione.

§ Mucosite, diarrea, vomito, nausea, iperbilirubinemia, insufficienza renale acuta, rash cutaneo

Chi-square test

Tabella 12. Criteri diagnostici per le IFI (De Paw *et al*, CID 2005)

Type of factor or criterion, disease	Criterion
Host factors	Neutropenia: neutrophil count of <math><500\text{ cells/mm}^3</math> for >10 days Persistent fever for >96 h refractory to appropriate treatment with broad-spectrum antibacterials Body temperature of >38°C or <36°C and any of the following predisposing conditions: Prolonged neutropenia (>10 days) in previous 60 days Recent or current use of significant immunosuppressive agents in the previous 30 days Proven or probable invasive fungal infection during a previous episode of neutropenia Coexistence of symptomatic AIDS Signs and symptoms indicating graft-versus-host disease Prolonged use of corticosteroids (>3 weeks) in previous 60 days
Microbiological criteria	Detection of mold (including <i>Aspergillus</i> species, <i>Fusarium</i> species, Zygomycetes, and <i>Scedosporium</i> species) or <i>Cryptococcus neoformans</i> by culture from sputum or BAL fluid Detection of a mold by cytology/direct microscopy or culture from sinus aspirate Detection of a mold or <i>Cryptococcus</i> species from sputum or BAL fluid Detection of <i>Aspergillus</i> antigen in BAL fluid, CSF, or >2 blood samples Detection of cryptococcal antigen in blood Detection of fungal elements by cytology/direct microscopy in sterile body fluids Detection of <i>Candida</i> casts in urine in the absence of a urinary catheter Detection of <i>Candida</i> species in blood by culture
Clinical criteria ^a	
Lower respiratory tract infection	
Major	Any of the following new infiltrates on CT imaging: halo sign, air-crescent sign or cavity within an area of consolidation
Minor	Symptoms (cough, chest pain, hemoptysis, or dyspnea) Physical finding of pleural rub Any new infiltrate not fulfilling major criteria Pleural effusion
Sinonasal infection	
Major	Radiological evidence suggestive of invasive infection in the sinuses (i.e., erosion of sinus walls or extension of infection to neighboring structures, or extensive skull base destruction)
Minor	Upper respiratory symptoms (e.g., nasal discharge, stuffiness) Nose ulceration or eschar of nasal mucosa or epistaxis Periorbital swelling Maxillary tenderness Black necrotic lesions or perforation of the hard palate
CNS infection	
Major	Radiological evidence suggesting CNS infection (e.g., mastoiditis or other parameningeal foci or extradural empyema)
Minor	CSF negative for other pathogens and malignant cells by culture or microscopy Focal neurological symptoms and signs (including focal seizures, hemiparesis, and cranial nerve palsies) Mental changes Meningeal irritation findings Abnormalities in CSF biochemistry and cell count
Disseminated fungal infection, major	Papular or nodular skin lesions without any other explanation Intraocular findings suggestive of hematogenous fungal chorioretinitis or endophthalmitis
Chronic disseminated candidiasis, ^b major	Small, peripheral, target-like abscesses (bull's eye) in liver and/or spleen demonstrated by CT, MRI, or ultrasonography

NOTE. Boldface indicates controversial elements considered to require revision or clarification. BAL, bronchoalveolar lavage.

^a Must be related to the site of microbiological criteria and temporally related to current episode.

^b Supporting microbiological criteria are not required for probable category.

Tabella 13. Incidenza di FUI, infezioni batteriche e fungine in 224 pazienti affetti da LAM all'esordio, consecutivamente trattati con regimi di induzione includenti Fluda (FLAI/FLAIE).

	AML97 (70 pz)	AML99 (65 pz)	AML02 (89 pz)	P#	Totale (224 pz)
FUI	36/70 (51%)	39/65 (60%)	71/89 (80%)	0.0006	146/224 (65%)
Infezioni da Gram negativi	12/70 (17%)	9/65 (14%)	9/89 (10%)	n.s.	30/224 (13%)
Infezioni da Gram positivi	13/70 (19%)	10/65 (15%)	24/89 (27%)	n.s.	47/224 (21%)
IFI possibili	1/70 (1%)	5/65 (8%)	8/89 (9%)	n.s.	14/224 (6%)
IFI probabili/certe	2/70 (3%)	3/65 (5%)	5/89 (6%)	n.s.	10/224 (4%)
<u>IFI probabili</u>					
<i>A. species</i>	0	2	2		4
<i>A. fumigatus</i>	1	0	0		1
<i>A. flavus</i>	1	0	0		1
<i>C. glabrata</i>	0	0	1		1
<i>C. krusei</i>	0	1	0		1

Chi-square test

Tabella 14. Confronto dell'incidenza di FUI e infezioni in 224 pazienti affetti da LAM di nuova diagnosi dopo una induzione includente Fluda 8FLAI/FLAIE) e dopo il primo consolidamento.

	Induzione (224 pz)	Primo consolidamento (214 pz)	P#
FUI	146/224 (65%)	75/214 (35%)	<0.0001
Infezioni da Gram negativi	30/224 (13%)	43/214 (20%)	n.s.
Infezioni da Gram positivi	47/224 (21%)	40/214 (19%)	n.s.
IFI possibili	14/224 (6%)	6/214 (3%)	n.s.
IFI probabili/certe	10/224 (4%)	5/214 (2%)	n.s.
<u>IFI certe</u>	<i>A. species: 4</i> <i>A. fumigatus: 1</i> <i>A. flavus: 1</i> <i>C. glabrata: 1</i> <i>C. krusei: 1</i>	<i>A. fumigatus: 3</i> <i>Fusarium spp.: 1</i> <i>C. albicans: 1</i>	

Chi-square test

Figura 1: La glicoproteina PGP

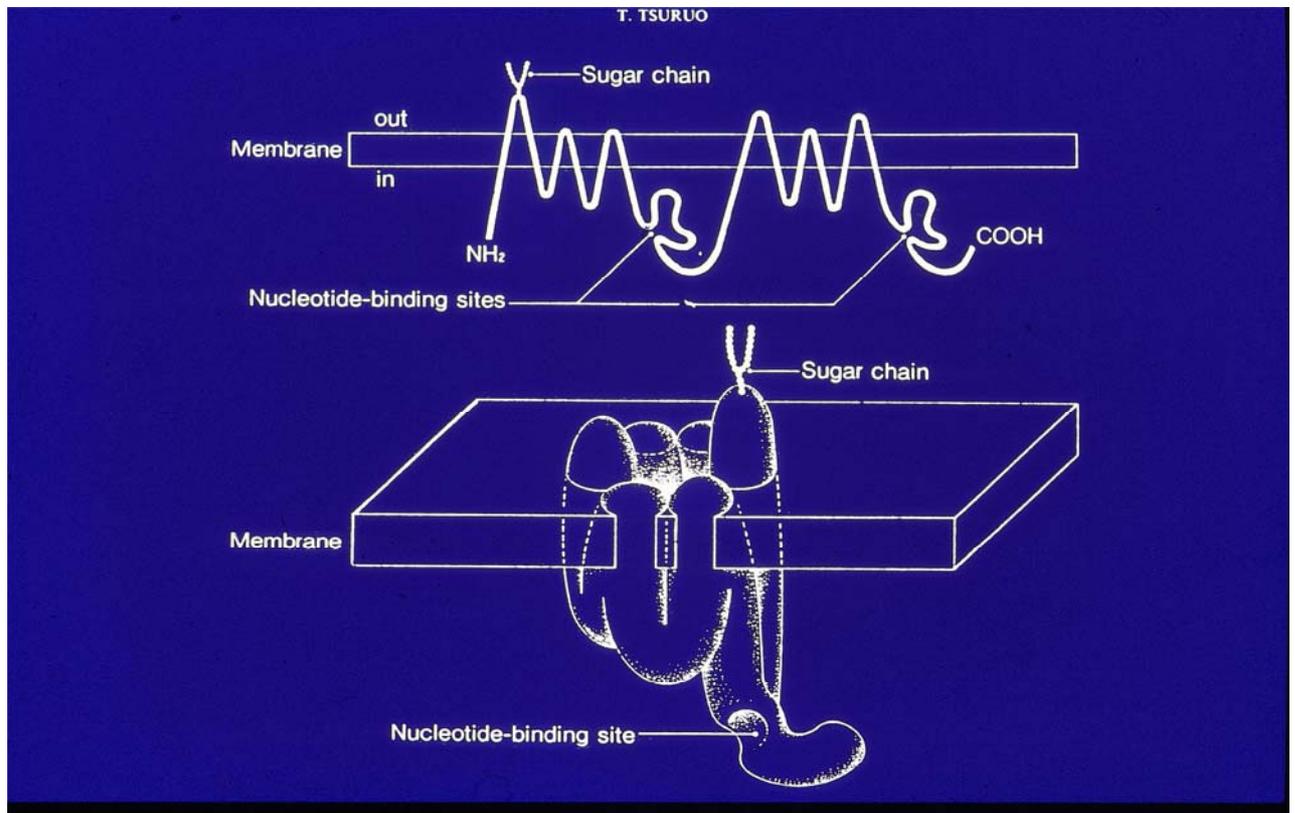


Figura 2: La Lung Resistance Related Protein (LRP)

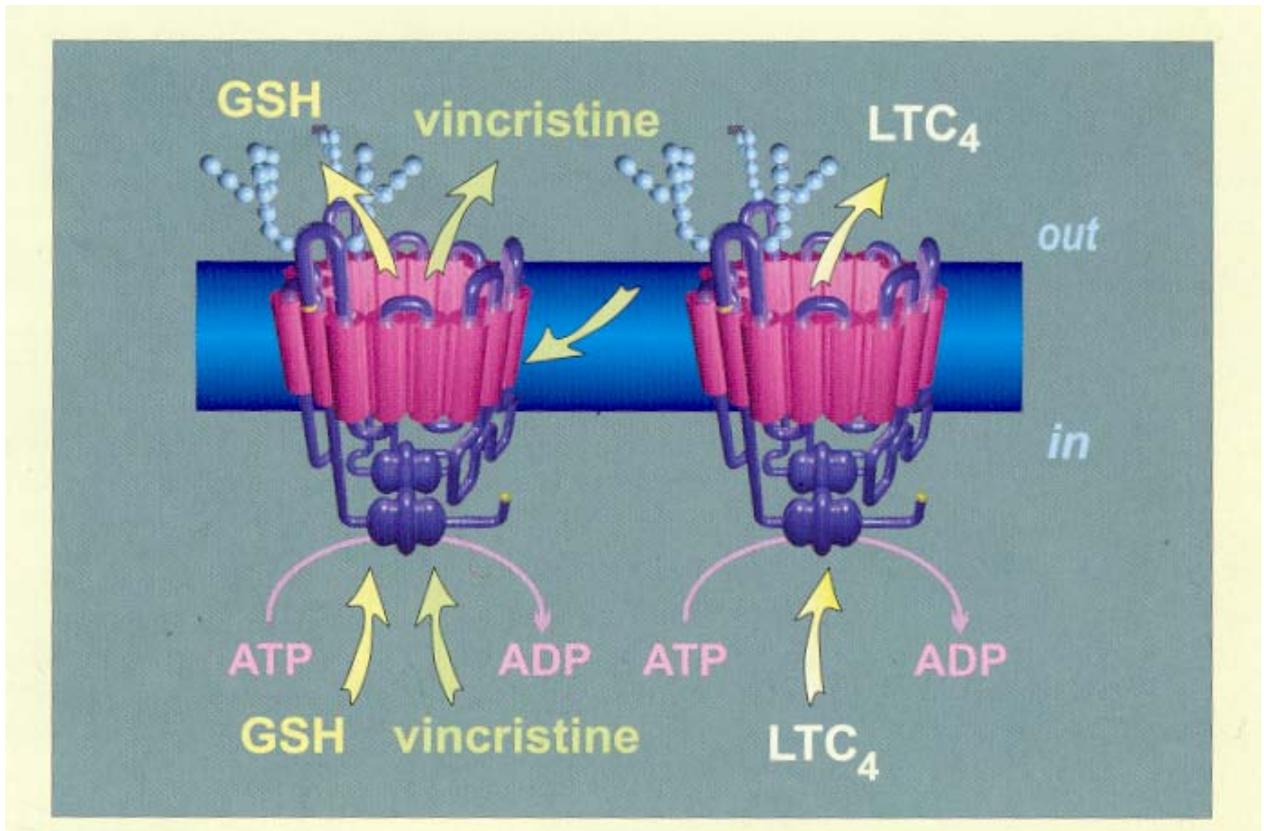


Figura. 3. Farmaci chemioterapici metabolizzati mediante Pgp

MDR: FARMACI COINVOLTI						
	MDR-1 Pgp	MRP-1	MRP-2	MRP-3	LRP	BCRP
<u>ANTHRACYCLINES</u>	●	●	●		●	●
<u>MITOXANTRONE</u>	●				●	●
<u>VINCA ALKALOIDS</u>	●	●		●	●	
<u>EPIPODOPHYLLINE DER</u>	●	●	●	●	●	
TAXANES	●					
CAMPHOTECINE DER	●	●				●
HOMOHARRINGTONINE	●	●				
<u>CALICHEAMICIN</u>	●					
ACTINOMYCIN D	●	●				
PLATINUM			●			
MTX			●	●		

Figura 4. Struttura chimica della Fludarabina e suo metabolismo a molecola chimicamente attiva

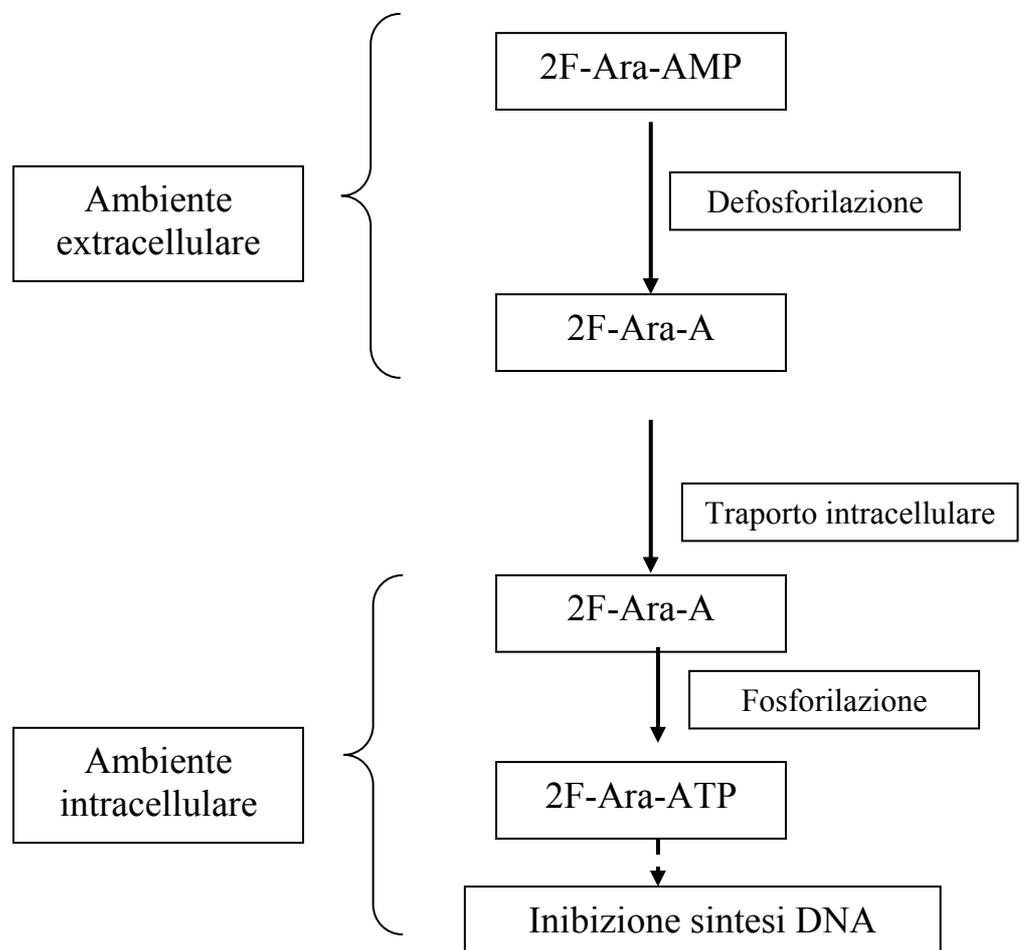
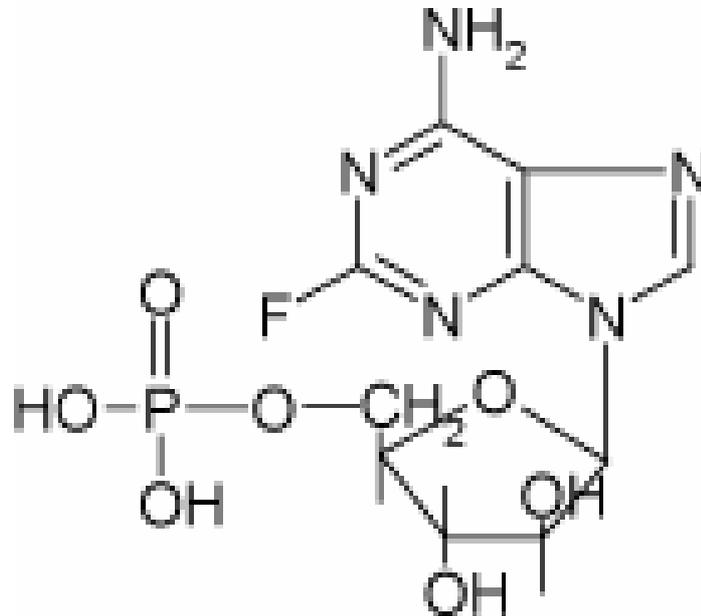


Figura 5: Attività e sinergismo della Fludarabina con la Citosina Arabinoside

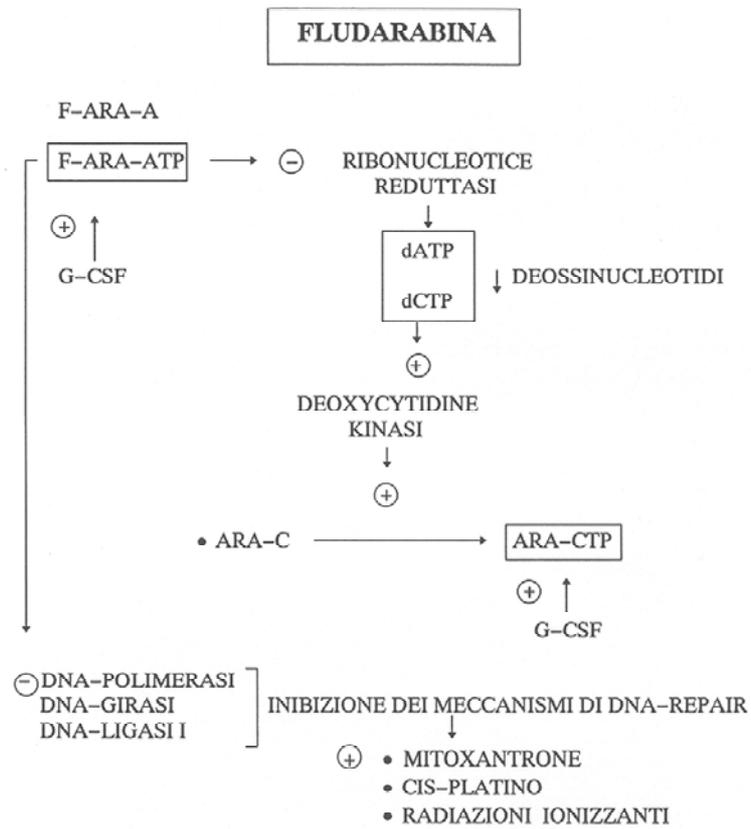


Figura 6. OS e DFS dei 118 pazienti valutabili in base al random FLAI vs ICE (protocollo AML 99)

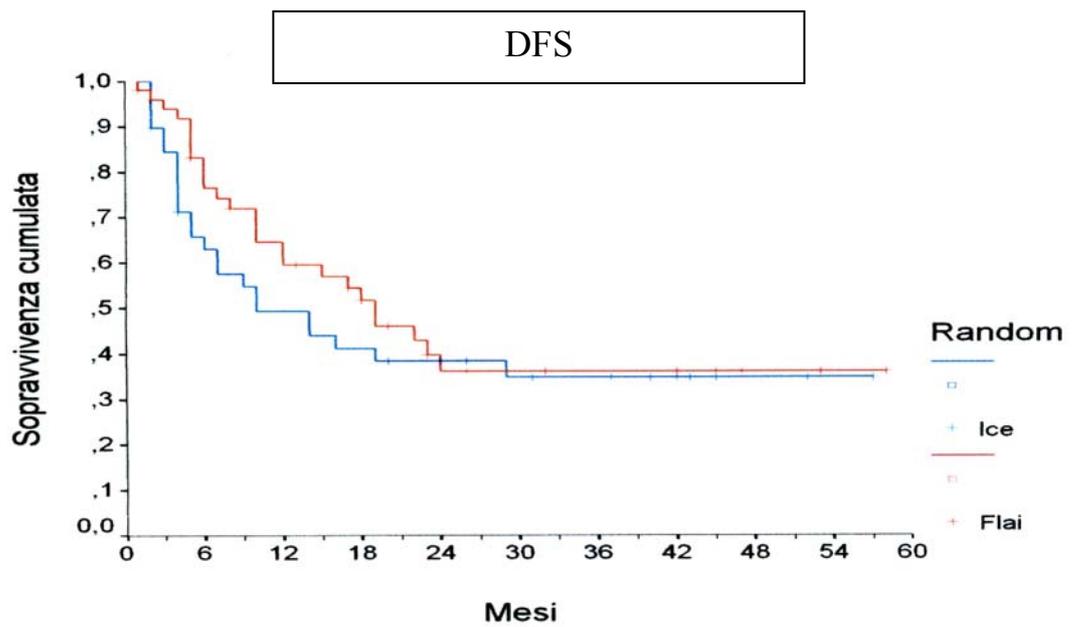
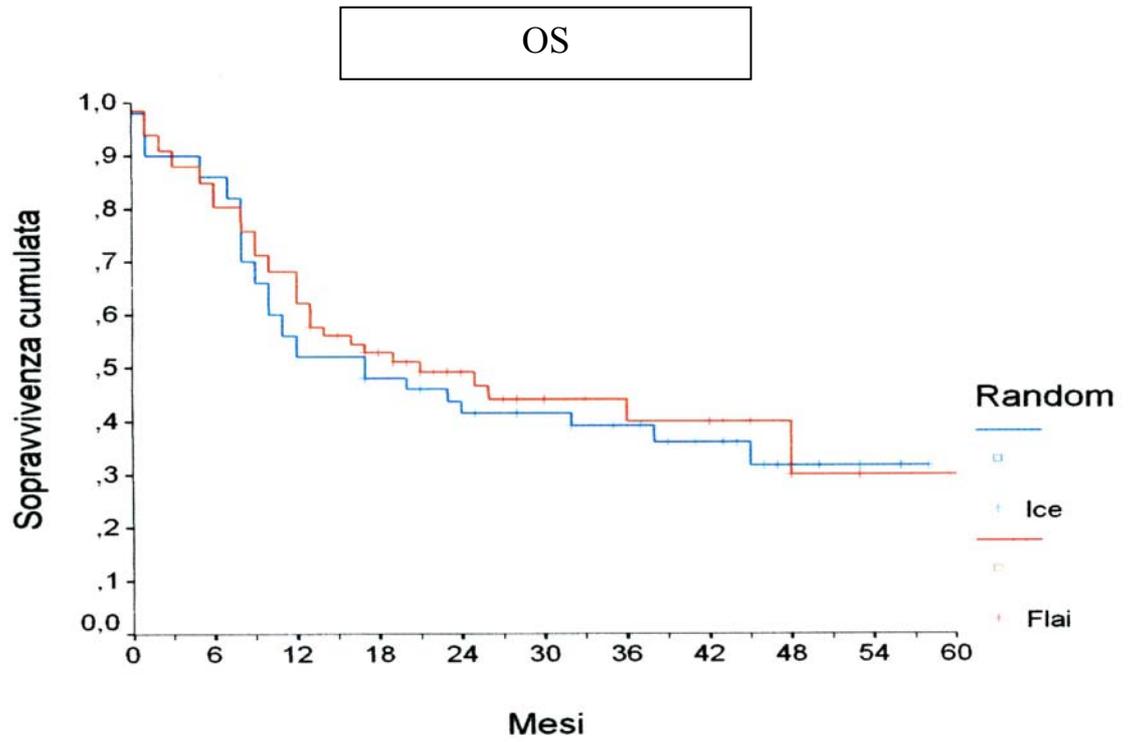


Figura 7. OS dei pazienti del protocollo AML 99 in base all'espressione dell'MDR

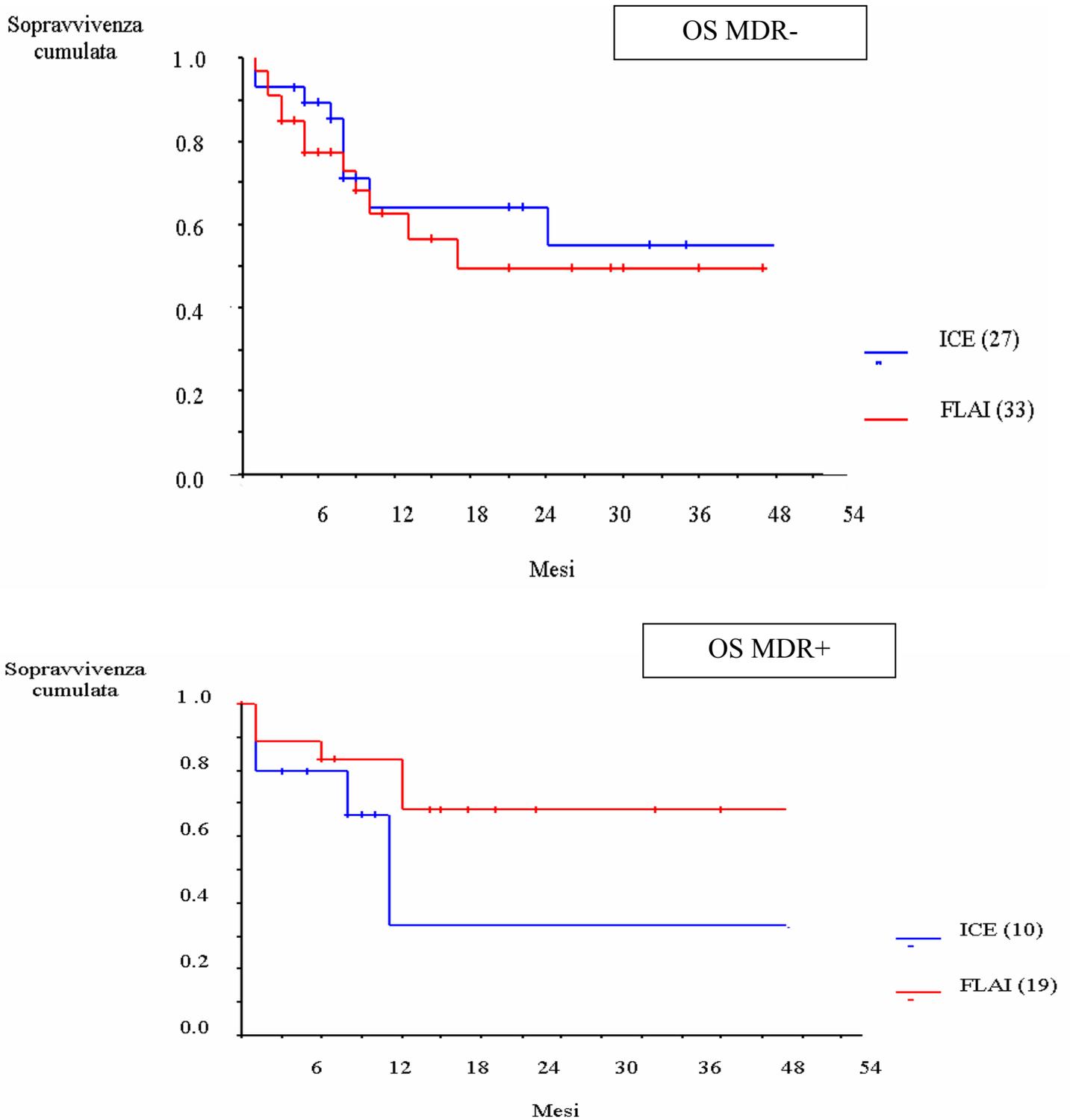


Figura 8. OS e DFS di 106 pazienti con LAM di nuova diagnosi ed età ≤ 65 aa, trattati con regimi di induzione includenti Fludarabina (casi) vs 106 pazienti con LAM di nuova diagnosi ed età ≤ 60 aa, trattati con regimi di induzione convenzionali, non includenti Fludarabina (controlli).

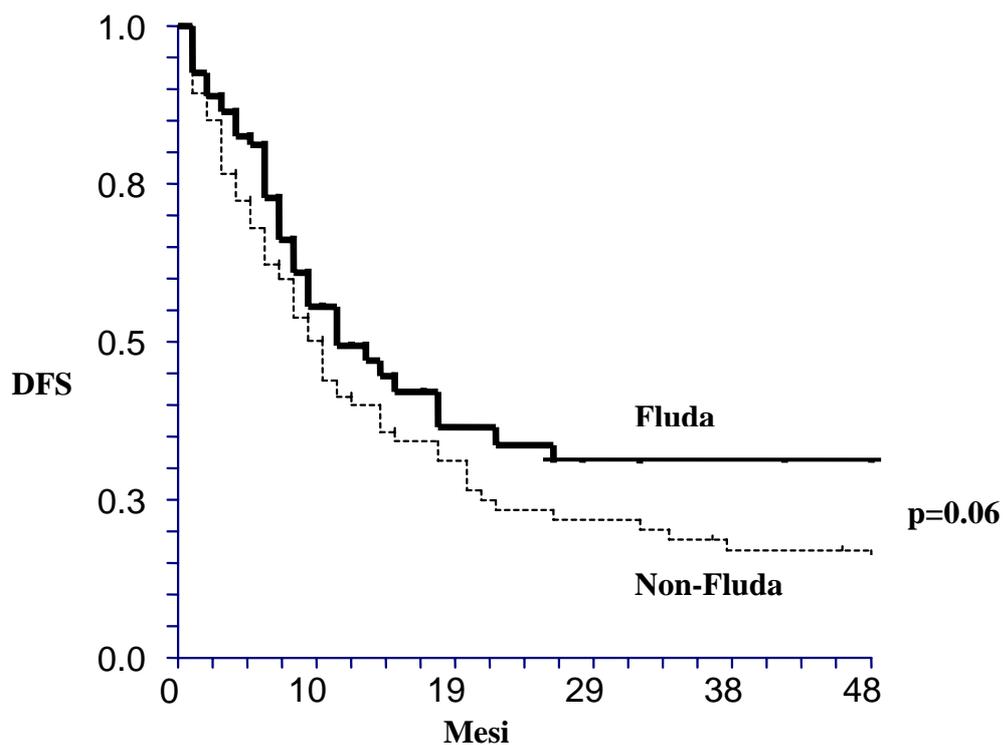
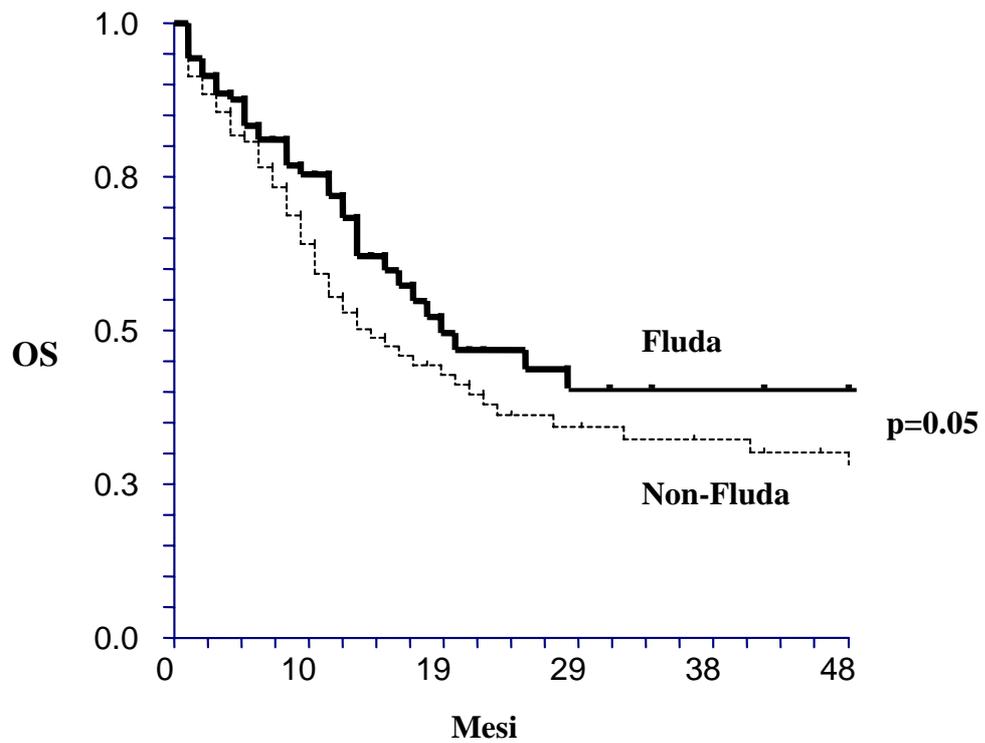


Figura 9. OS e DFS di 75 pazienti con LAM di nuova diagnosi a fenotipo MDR-Pgp positivo, in base al regime di induzione ricevuto (FLAI/FLAIE vs altro).

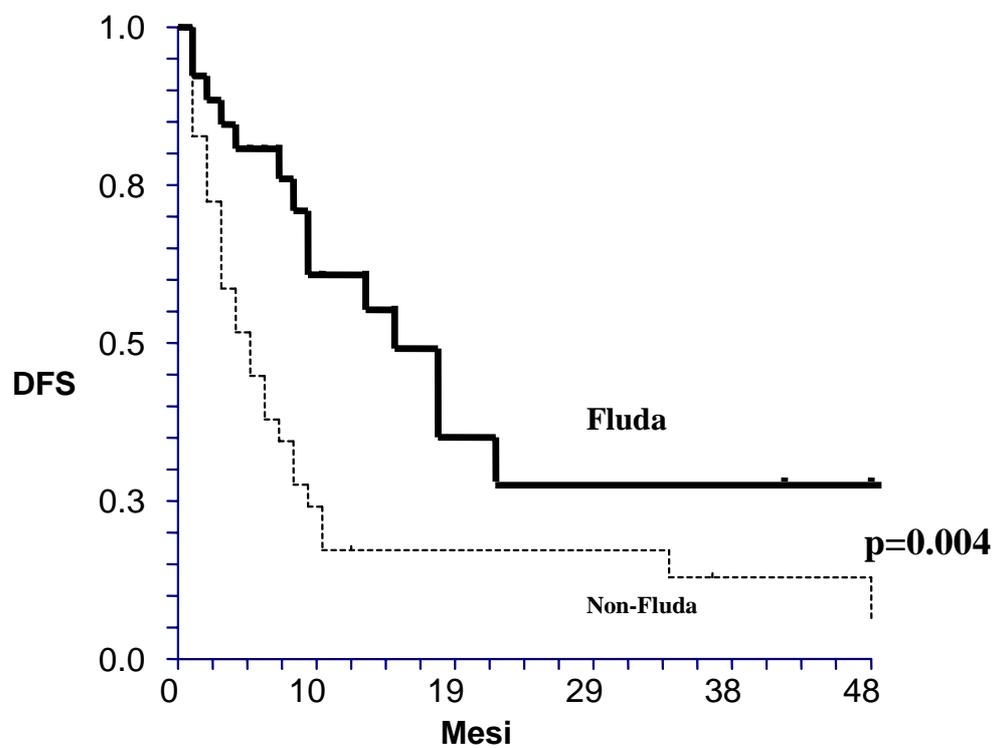
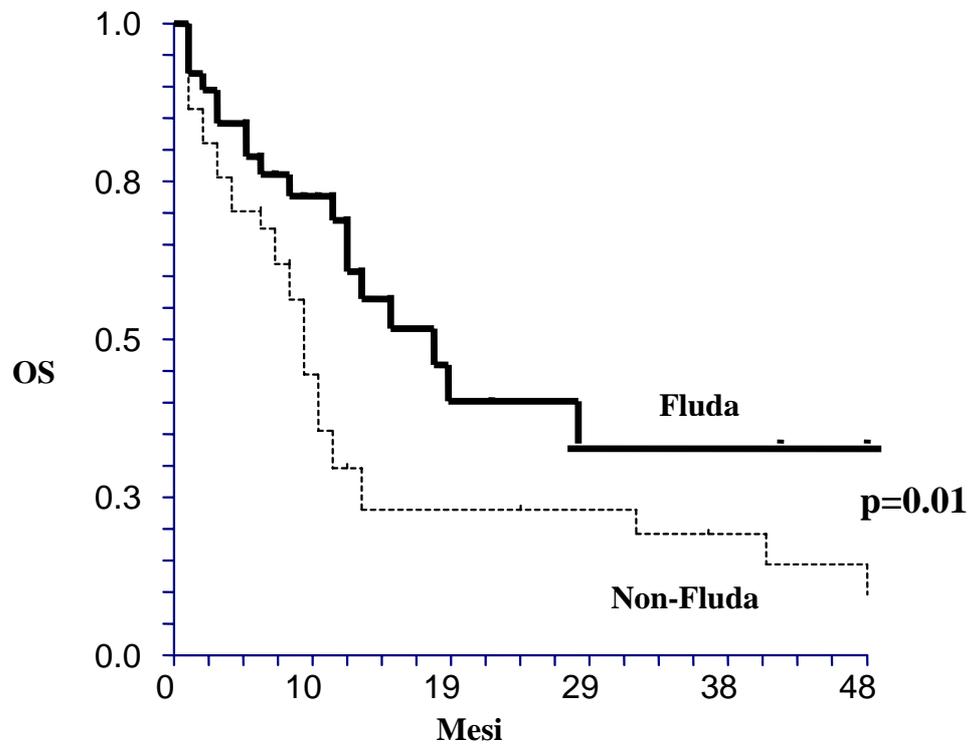


Figura 10. OS e DFS di 133 pazienti con LAM di nuova diagnosi a fenotipo MDR-Pgp negativo, in base al regime di induzione ricevuto (FLAI/FLAIE vs altro).

